2010
ТОМ VIII
Выпуск 3

экологическая генетика

Рецензируемый научно-практический журнал

Основан в 2003 году в Санкт-Петербурге

ISSN 1811–0932
Key title: Èkologičeskaâ genetika
Abbreviated key title: Èkol. genet.

Èkol. genet. — 2010. — T. VIII, Вып. 3

Ежеквартальное издание

Рекомендован ВАК для публикаций научных работ, отражающих основное содержание докторских и кандидатских диссертаций

Журнал реферируется РЖ ВИНИТИ

Проект реализован при финансовой поддержке Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга

Издатель, учредитель:
ООО «Издательство Н-Л»
Родин В. Г. (ген. директор)
Титова Л. А. (выпускающий редактор)
Фролов В. Н. (верстка)
Адрес: Автовская ул., 17, 1-й этаж, Санкт-Петербург, 198152;
тел./факс: (812) 784-97-51; e-mail: nl@n-l.ru

При содействии:
Санкт-Петербургского научного центра РАН;
Вавиловского общества генетиков и селекционеров;
кафедры генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета;
НОЦ «Молекулярно-биологические основы здоровья человека и окружающей среды Северо-Запада России»

Проект-макет: ***Ф. В. Равдоникас***

Журнал зарегистрирован Государственным комитетом РФ по печати ПИ № 77-16900 от 20 ноября 2003 года

Распространяется по подписке:
Печатная версия (бумажная) — индекс издания **25 603** по каталогу агентства «Роспечать»;
Электронная версия — http://www.elibrary.ru
http://gene-on-gene.narod.ru

Формат 90×60 1/8. Усл. печ. л. 8
Отпечатано с готовых диапозитивов ООО «Издательство Н-Л» в ООО «Светлица». Тираж до 500 экз.

Полное или частичное воспроизведение материалов, содержащихся в настоящем издании, допускается только с письменного разрешения редакции. Ссылка на журнал «Ecological genetics/ Экологическая генетика» обязательна

❀ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ФАКТОРЫ СРЕДЫ

Кулаева О. А., Цыганов В. Е.
Молекулярно-генетические основы устойчивости высших растений к кадмию и его аккумуляции 3

❀ СИМБИОГЕНЕТИКА

Воробьев Н. И., Проворов Н. А.
Моделирование эволюции бобово-ризобиального симбиоза на повышение функциональной интегрированности партнеров и экологической эффективности их взаимодействия 16

❀ ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

Стариченко В. И.
Метаболизм остеотропных токсических веществ: наследственная детерминация 27

❀ ГЕНЕТИКА ПОПУЛЯЦИЙ И ЭВОЛЮЦИЯ

Чекунова Е. М.
Генетика биосинтеза хлорофилла: темновой и светозависимый пути 38

Михайлова Ю. В., Гусарова Г. Л., Брохман К.
Молекулярная изменчивость и филогеография смолевки бесстебельной *Silene acaulis* (L.) Jacq. (*Caryophyllaceae*) на севере Европы и архипелаге Шпицберген 52

Удалов М. Б., Беньковская Г. В.
Изменения уровня полиморфизма в популяциях колорадского жука на Южном Урале 61

❀ СТАРЕНИЕ И ДОЛГОЛЕТИЕ

Москалев А. А., Малышева О. А.
Роль генов транскрипционного фактора *dFOXO, dSir2* и *Hsp70* в изменении продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* при различных режимах освещения 67

❀ ВЫ СПРАШИВАЕТЕ

Правила для авторов 81

© ООО «Издательство Н-Л»

Главный редактор
Инге-Вечтомов С. Г.

Академик РАН, кафедра генетики и селекции СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

Лутова Л. А.
(зам. главного редактора)
профессор
кафедра генетики и селекции СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Баранов В. С.
(зам. главного редактора)
член-корреспондент РАМН, профессор
НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Тихонович И. А.
академик РАСХН
Всероссийский НИИ
сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, Россия

Скрябин К. Г.
академик РАН
академик РАСХН
Центр «Биоинженерия»,
Москва, Россия

Хотылева Л. В.
академик НАН Белоруссии
Институт генетики и цитологии
НАН Беларуси, Минск,
Республика Беларусь

Захаров-Гезехус И. А.
член-корр. РАН
советник РАН, Россия

Шумный В. К.
академик РАН
Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

Мыльников С. В.
(ответственный секретарь)
кандидат биологических наук
кафедра генетики и селекции СПбГУ,
Санкт-Петербург, Россия

Шестаков С. В.
академик РАН
кафедра генетики и селекции МГУ,
Москва, Россия

Колчанов Н. А.
академик РАН
Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

Степченкова Е. И.
(секретарь)
кандидат биологических наук
кафедра генетики и селекции СПбГУ,
Санкт-Петербург, Россия

Ранчалис В. П.
член-корр. АН Литвы, профессор
Lietuvos Moksl Akademija, Biologijos
medicinos ir geomoksl skyrius,
Вильнюс, Литва

Янковский Н. К.
член-корр. РАН
д. б. н., профессор
Институт общей генетики, Москва, Россия

Вашукова Е. С.
(секретарь)
кафедра генетики и селекции СПбГУ,
Санкт-Петербург, Россия

Редакционный совет

Жученко А. А.
академик РАН
академик РАСХН
Президиум РАСХН,
Москва, Россия

Горбунова В. Н.
профессор
кафедра медицинской генетики
СПбГПМА, Санкт-Петербург, Россия

Глеба Ю. Ю.
академик АН Украины
Институт клеточной биологии
и генетической инженерии
НАН Украины,
Киев, Украина

Козлов А. П.
профессор
Биомедицинский центр,
Санкт-Петербург, Россия

Павлов Ю. И.
д. б. н.
Department of Biochemistry and Molecular Biology Eppley Institute for Research in Cancer and Allied Diseases, США

Лазутка Й.
профессор
Вильнюсский университет,
Вильнюс, Литва

Тарасов В. А.
профессор
Институт общей генетики
им. Н. И. Вавилова РАН,
Москва, Россия

Лазюк Г. И.
член-корреспондент РАМН и НАН
НИИ наследственных и врожденных
заболеваний МЗ Республики Беларусь,
Минск, Республика Беларусь

Кильчевский А. В.
член-корреспондент НАН Беларуси
Институт генетики и цитологии, Минск,
Республика Беларусь

Асланян М. М.
профессор
кафедра генетики и селекции МГУ,
Москва, Россия

Для опубликования статей просьба направлять материалы в редакцию по адресу: Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034. Тел./факс: (812) 328-15-90, e-mail: ecolgenet@list.ru (см. Правила для авторов). Электронная версия журнала: http://gene-on-gene.narod.ru

УДК 575.1/.2:574.2

© О. А. Кулаева[1,2], В. Е. Цыганов[1]

[1] ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН
[2] Санкт-Петербургский государственный университет

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УСТОЙЧИВОСТИ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ К КАДМИЮ И ЕГО АККУМУЛЯЦИИ

❀ Кадмий (Cd) является одним из наиболее широко распространенных и опасных загрязняющих элементов для всех живых организмов, включая растения. В настоящее время ведутся интенсивные исследования механизмов накопления Cd в тканях растений и их устойчивости к его токсичному действию. Были получены данные о варьировании признаков устойчивости и накопления Cd в природных популяциях как видов-гипераккумуляторов, так и ценных сельскохозяйственных культур. Получен ряд мутантов с измененной чувствительностью к данному тяжелому металлу. В последнее десятилетие выявлено несколько классов белков, участвующих в ответах клетки на действие ионов Cd. Недавно была показана важная роль микроРНК в адаптации растений к Cd. Исследования молекулярно-генетических механизмов аккумуляции Cd и устойчивости к нему растений служат теоретической базой для разработки методов фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами, а также селекции сортов сельскохозяйственных растений с пониженной аккумуляцией Cd.

❀ **Ключевые слова**: генетический анализ устойчивости к кадмию; гипераккумуляция; переносчики металлов; металлотионеины; фитохелатины; микроРНК; фиторемедиация; транскриптомный анализ; сверхэкспрессия гена; РНК-интерференция.

Поступила в редакцию 09.12.2009.
Принята к публикации 12.05.2010.

Тяжелые металлы являются одними из основных загрязнителей окружающей среды, причем они поступают в почву, водоемы и атмосферу как в результате естественных процессов (выветривание горных пород, вулканическая деятельность), так и в результате хозяйственной деятельности человека (горнодобывающая, металлургическая, химическая промышленность, транспорт, внесение минеральных удобрений) (Титов и др., 2007). Cd является одним из наиболее опасных и широко распространенных загрязняющих элементов. За последние 50 лет в окружающую среду было выброшено 22 000 тонн Cd (Singh et al., 2003). Передача Cd по пищевым цепям может вызывать серьезные нарушения жизнедеятельности у многих живых организмов (Sanita di Toppi et al., 1999).

У растительных организмов выделяют два вида устойчивости: ***основная*** устойчивость, присущая большинству растений, и ***гиперустойчивость*** к определенным металлам (Clemens, 2001). Гиперустойчивость может быть опосредована, как за счет механизмов исключения Cd, так и за счет гипераккумуляции металлов в наземной части растения (Baker, 1981; Clemens, 2006). К растениям-гипераккумуляторам принято относить растительные организмы, способные накапливать металлы в надземной части в концентрации в 100–1000 раз превышающей таковую у обычных растений (Brooks, 1998). Гипераккумуляция Cd и гиперустойчивость к Cd были описаны только для четырех видов растений *(Thlaspi caerulescens, Thlaspi praecox, Arabidopsis halleri и Sedum alfredii)*, которые также являются гипераккумуляторами цинка, некоторые исследователи относят к гипераккумуляторам Cd также и *Brassica juncea* (Verbruggen et al., 2009). Исследование механизмов гиперустойчивости к Cd и его гипераккумуляции вызывает огромный интерес как основа для разработки технологий фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами (Peer et al., 2005).

Многие аспекты устойчивости растений к Cd были подробно освещены в ряде обзоров (Серегин, 2001; Титов и др., 2007; Sanita di Toppi et al., 1999; Clemens, 2006; DalCorso et al., 2008; Grant et al., 2008; Verbruggen et al., 2009). В нашем обзоре мы уделим особое внимание последним достижениям в области исследований молекулярно-генетических механизмов устойчивости растений к Cd.

ВЛИЯНИЕ Cd НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Cd не является элементом, необходимым для роста большинства растений и животных и не участвует в каких-либо процессах клеточного метаболизма за редким исключением диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii*, у которой он присутствует в молекуле карбоновой ангидразы вместо цинка (Lane et al., 2005). Другим возможным исключением являются некоторые популяции *T. caerulescens* с юга Франции, в которых Cd требуется растениям для оптимального роста (Roosens et al., 2003; Liu et al., 2008).

Cd поступает в живые организмы через переносчики металлов (цинка, железа) и кальциевые каналы. Довольно низкие концентрации Cd ингибируют основные физиологические процессы растений, такие как: рост, развитие, фотосинтез, дыхание, водный обмен, минеральное питание и продуктивность (Титов и др., 2007).

Показано, что большое сродство Cd к тиольным группам белков, замена ионом Cd иона цинка и других ионов в связывающих сайтах белков может вызывать ингибирование или изменение активности различных белков, вовлеченных в разнообразные процессы метаболизма, и также ингибировать репарацию ДНК (Clemens, 2006). Конкуренция Cd за сайты связывания с кальцием может изменять некоторые кальций-кальмодулин зависимые пути передачи сигнала (Rivetta et al., 1997). Cd также негативно влияет на функционирование элементов цитоскелета (Fusconi et al., 2007).

Также было описано негативное влияние Cd на развитие и функционирование симбиотических систем бобовых растений. Так, например, исследование влияния серии концентраций Cd на развитие симбиотических клубеньков и азотфиксирующую активность у сои показало, что хотя число клубеньков снижалось уже при самых низких концентрациях Cd (2 мг/кг почвы), в то же время наблюдалась некоторая стимуляция азотфиксирующей активности при концентрациях до 5 мг/кг почвы (Chen et al., 2003). Стимуляция азотфиксирующей активности при определенных невысоких концентрациях Cd наблюдалась нами для клубеньков модельного бобового *Lotus japonicus* (Цыганов и др., 2010).

В ряде исследований была показана роль микоризы в увеличении устойчивости растений к Cd. Так, при изучении нескольких генотипов гороха было показано, что инокуляция микоризным грибом *Glomus intraradices* увеличивает устойчивость растений к Cd (Rivera-Becerril et al., 2002). Тем не менее, механизмы такой устойчивости до конца не изучены (Rivera-Becerril et al., 2005).

МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К Cd И ЕГО АККУМУЛЯЦИИ

Обезвреживание поглощенных металлов может включать в себя разнообразные процессы, среди которых иммобилизация в клеточной стенке, образование комплексов с хелаторами, синтез стрессовых белков, синтез металлотионеинов и фитохелатинов, активное выведение ионов тяжелых металлов из клетки, компартментализация. Следует отметить, что в основном данные механизмы вовлечены в проявление как основной, так и гиперустойчивости к Cd. Тем не менее, имеются определенные различия. Основная устойчивость возникает в результате компартментализации Cd, связанного с фитохелатинами или другими хелаторами, в вакуоли. При этом бóльшая его часть остается в корне, и лишь незначительная часть Cd поступает в наземные органы. В возникновении гиперустойчивости синтез фитохелатинов не играет существенной роли (Ebbs et al., 2002), в то же время значительно усилен транспорт Cd в ксилему, по которой он поступает в наземные органы, в которых происходит его компартментализация (Hanikenne et al., 2008). В основном нами будут рассмотрены механизмы, вовлеченные в проявление растением основной устойчивости, на примере *Arabidopsis thaliana* (рис. 1).

Иммобилизация

Иммобилизация ионов Cd в клеточной стенке происходит как за счет необратимого связывания с ограниченным числом участков на поверхности клеточной стенки, так и с образованием комплексов с экстраклеточными углеводами (каллоза), гистидильными группами белков, а также с карбоксильными группами, размещенными на поверхности пектинов (рис. 1) (Zornoza et al., 2002).

Хелатирование органическими кислотами и аминокислотами

Органические кислоты (цитрат, малат) присутствуют в высоких концентрациях в растениях-гипераккумуляторах (Ueno et al., 2005), хотя их роль в феномене гиперустойчивости отвергается из-за их низких констант ассоциации с металлами (Callahan et al., 2006).

Недавно была показана важная роль триптофана в проявлении основной устойчивости растений к Cd (Sanjaya et al., 2008). Мутант *A. thaliana trp5-1*, характеризующийся сверхпродукцией триптофана, также характеризовался повышенной устойчивостью к Cd, в то время как ауксотрофный по триптофану мутант *trp2-1*, напротив, — пониженной. Также была показана индукция экспрессии гена *AtTSB1*, кодирующего бета-субъединицу триптофан-синтазы, в ответ на воздействие Cd. Трансгенные растения со сверхэкспрессией *AtTSB1* и повышенным уровнем триптофана проявляли повышенную устойчивость к Cd, но не его аккумуляцию. Предполагается, что триптофан может выполнять хелатирующую функцию по отношению к ионам Cd (рис. 1). Кроме того, было показано, что увеличенный уровень триптофана в трансгенных растениях *A. thaliana* может супрессировать экспрессию генов, кодирующих переносчики металлов. Полученные результаты открывают интересные перспективы для селекции сельскохозяйственных растений с повышенной устойчивостью к Cd, сниженным его накоплением и повышенным содержанием триптофана (Sanjaya et al., 2008).

Синтез стрессовых белков

Было установлено, что у различных растений Cd индуцирует синтез ряда стрессовых белков, в том числе, белков теплового шока (БТШ) и шаперонов (Clemens, 2001). У *A. thaliana* был выявлен металлошаперон CdI19, представляющий собой белок массой

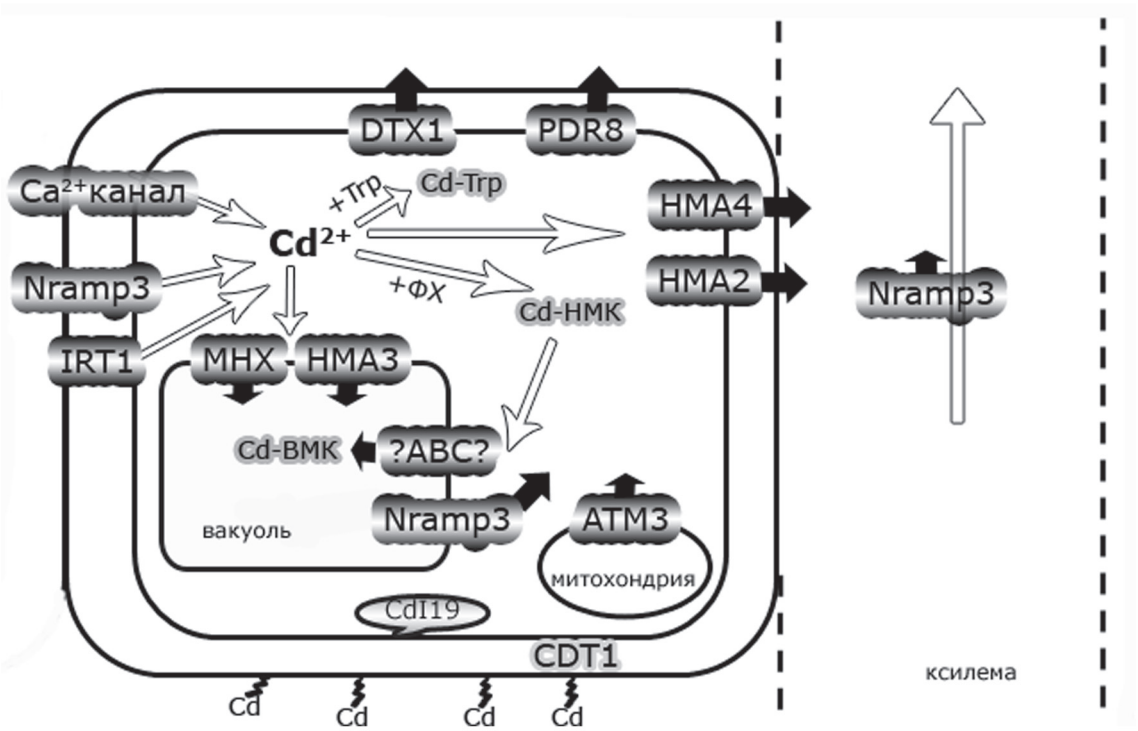

Рис. 1. Пути транспорта кадмия в растительной клетке на примере *A. thaliana*. Представлено схематичное изображение клетки и ксилемы корня. Стрелками показано направление переноса кадмия. Из окружающей среды кадмий попадает в клетку через переносчики железа или цинка, относящиеся к ZIP семейству, а также через кальциевые каналы. Часть ионов кадмия связывается с элементами клеточной стенки клеток корня и короткими пептидами семейства CDT1. При попадании в цитоплазму кадмий связывается с фитохелатинами (ФХ) с образованием низкомолекулярных комплексов (НМК), которые переносятся в вакуоль через неидентифицированный ABC переносчик, где происходит формирование высокомолекулярных комплексов (ВМК). Также ионы кадмия могут транспортироваться в вакуоль посредством переносчиков HMA3 и MHX. Часть кадмия может транспортироваться из вакуоли обратно в цитоплазму через переносчик Nramp3. В ксилему кадмий попадает благодаря работе белков HMA2 и HMA4, по которой он транспортируется в надземные органы переносчиком Nramp. Предполагается, что в цитоплазме часть кадмия может быть переведена в неактивную форму посредством связывания с триптофаном (Trp). Металлошапероны (CdI19) играют важную роль в поддержании концентраций металлов в клетке на соответствующем уровне, связывая и доставляя их хелаторам металлов, например, фитохелатинам. PDR8, являющийся представителем ABC переносчиков, играет ключевую роль в выбросе кадмия из клетки. Другой представитель ABC переносчиков ATM3 вовлечен в поддержание гомеостаза Cd в митохондриях. Переносчик DTX1, локализованный на плазматической мембране, осуществляет транспорт различных токсичных веществ (алкалоидов, антибиотиков), в том числе и Cd, из цитоплазмы клетки.

42,2 кДа с двумя металл-связывающими мотивами CXXC, в которых два остатка цистеина ответственны за связывание с тяжелым металлом (Suzuki et al., 2002). Наряду с Cd, данный белок способен связывать ртуть и медь. Для CdI19 характерно посттрансляционное присоединение к его C-концу изопреноида, обеспечивающего прикрепление белка к плазматической мембране (рис. 1). Трансгенные растения со сверхэкспрессией CdI19 проявляли бóльшую устойчивость к Cd по сравнению с исходными растениями. Предполагается, что металлошапероны играют важную роль в поддержании концентраций металлов в клетке на соответствующем уровне, связывая и доставляя их хелаторам металлов, например, фитохелатинам (Suzuki et al., 2002).

Цистеин-богатые пептиды и белки

В один из основных механизмов проявления основной устойчивости к Cd вовлечены гены, контролирующие уровень синтеза цистеина, а также кодирующие разнообразные семейства белков и пептидов, отличительной особенностью которых является высокое содержание цистеина в их составе.

Важная роль в устойчивости растений *A. thaliana* была показана для гена *Atcys-3A*, кодирующего фермент O-ацетилсерин(тиол)лиазу, который катализирует финальный шаг в синтезе цистеина (Dominguez–Solís et al., 2001). Нозерн-блоттинг показал, что Cd через 18 часов вызывает максимум индукции экспрессии данного гена. *In situ* гибридизация выявила быструю аккумуляцию мРНК в листовой пластинке, коре корня и стеб-

ля и проводящих тканях стебля после обработки Cd. Было показано, что трансгенные растения с 9-кратной сверхэкспрессией гена *Atcys-3A* характеризуются повышенной устойчивостью к Cd, подтверждая, что данная устойчивость обусловлена увеличенной доступностью цистеина. Фармакологический подход также показал, что экзогенный цистеин может частично улучшать рост растений на среде, содержащий Cd (Dominguez–Solís et al., 2001).

У *A. thaliana* было выявлено семейство AtPcr, состоящее из 10 цистеин-богатых белков, 4 из которых обеспечивают устойчивость растений к Cd, изменяя мембранный транспорт Cd и снижая его поступление в клетку (Song et al., 2004). Все белки этого семейства характеризуются наличием на N-конце гидрофобного домена, формирующего 2 трансмембранные спирали и гидрофильного C-конца. При этом гидрофобный N-конец обогащен остатками цистеина и содержит консервативный для всех членов семейства Pcr мотив CCXXXXCPC. Данные остатки цистеина играют важную роль в детоксикации Cd, поскольку делеции этой области или мутации, приводящие к заменам цистеина, снижают способность AtPcr1 поддерживать устойчивость к Cd у дрожжей, экспрессирующих гены *AtPcr*. Обработка растений *A. thaliana* Cd приводит к увеличению уровня экспрессии генов *AtPcr1* and *AtPcr2*, что соответствует их роли в обеспечении устойчивости к Cd. Предполагается, что белки семейства Pcr могут быть вовлечены в поддержание гомеостаза тяжелых металлов (Song et al., 2004). Тем не менее, возможно, что они могут иметь дополнительные функции, не связанные с устойчивостью к тяжелым металлам, поскольку гены *AtPcr* экспрессируются конститутивно в зрелых листьях. Более того, один из возможных гомологов данного семейства у петунии *PGP/D12* индуцируется во время прорастания пыльцевой трубки (Guyon et al., 2000).

У *Digitaria ciliaris* был выявлен ген *DcCDT1*, который кодирует пептид, состоящий из 55 а. к., 15 из которых являются цистеином. У однодольных растений выявлены мультигенные семейства, гомологичные *DcCDT1*. В то же время, у двудольных растений выявлено только по единичному гомологу данного гена. Для DcCDT1 показана локализация, как в клеточной стенке, так и на плазматической мембране. Трансгенные растения *A. thaliana*, с конститутивной экспрессией *DcCDT1*, более устойчивы к кадмию за счет снижения накопления кадмия в клетке (рис. 1) (Matsuda et al., 2009).

Синтез металлотионеинов

Металлотионеины — это небольшие (45–85 а. к.) богатые цистеином белки, которые считаются специфичными в отношении связывания ионов металлов и синтезируются в клетках животных и растений в ответ на воздействие тяжелых металлов. В отличие от животных у растений металлотионеины кодируются большими генными семействами (Palmiter, 1998). Примечательно, что различия в нуклеотидных последовательностях между генами металлотионеинов различных видов растений меньше, чем различия между генами, представляющими разные классы металлотионеинов, что свидетельствует о том, что разные классы возникли до дивергенции на одно- и двудольные (Zimeri et al., 2005). Роль металлотионеинов в детоксикации Cd все еще остается практически неизученной (DalCorso et al., 2008). Так, было показано связывание PsMTa из гороха с различными металлами, в том числе и с Cd, при гетерологичной экспрессии этого гена в *Escherichia coli* (Tommey et al., 1991). Сверхэкспрессия мышиного металлотионеина в растениях табака увеличила устойчивость растений к Cd *in vivo* (Pan et al., 1994), в то время как эктопическая экспрессия гена *MT2 B. juncea* в *A. thaliana* привела к повышенной устойчивости к Cd и меди (Zhigang et al., 2006).

Синтез фитохелатинов

Одним из важнейших ответов растений на действие тяжелых металлов является индукция синтеза фитохелатинов, синтезирующихся из трипептида глутатиона (Глу-Цис-Гли) фитохелатинсинтазой. В настоящее время первичная структура фитохелатинов определена для широкого спектра видов покрытосеменных растений из различных семейств. Они представляют собой небольшие богатые цистеином пептиды, состоящие из линейных цепей остатков глутаминовой кислоты и цистеина и способные связывать ионы тяжелых металлов через SH группы. Основная структура этих пептидов следующая: (γГлу (Цис)) n–Гли, где n = 2–11 (обычно не более 6-ти) (Серегин, 2001). Фитохелатины обладают высоким сродством к ионам Cd (Reese, Wagner, 1987). Cd стимулирует синтез фитохелатинов, которые быстро образуют низкомолекулярные комплексы (НМК) с ионами Cd и транспортируются через тонопласт в вакуоль. Предполагается, что у растений НМК транспортируются через неидентифицированный ABC переносчик (см. раздел ABC переносчики), гомологичный ABC переносчику HMT1 *Schizos pombe* (Ortiz et al., 1992). Недавно было показано, что через такой переносчик в вакуоль могут поступать не только НМК, но и комплексы Cd с глутатионом (Prévéral et al., 2009). В вакуоли, по всей видимости, образуется высокомолекулярный комплекс (ВМК), служащий для более эффективной изоляции металла. В условиях кислой среды вакуоли, ВМК диссоциируют, и Cd связывается органическими кислотами (цитратом, оксалатом, малатом) (Krotz et al., 1989). Сравнительный анализ уровня синтеза фитохелатинов у гипераккумулятора *T. caerulescens* и негипераккумулятора *T. arvense*, выявил более низкий их уровень у *T. caerulescens*, что, по всей видимости, свидетельствует о том, что фитохелатины вовлечены в поддержание основной устойчивости к Cd, но не играют заметной роли в гиперустойчивости (Ebbs et al., 2002). При этом следует отметить, что недавно гены, кодирующие фитохелатинсинтазу, а также

ABC переносчик комплексов фитохелатинов с Cd были выявлены у животных (Vatamaniuk et al., 2001, 2005), что свидетельствует о консервативности механизма устойчивости, опосредованного фитохелатинами. Поэтому представляется целесообразным проведение дальнейших исследований для выявления возможной роли фитохелатинов в проявлении устойчивости к Cd у растений-гипераккумуляторов.

Переносчики Cd

В последние годы достигнут большой прогресс в понимании молекулярных механизмов транспорта металлов через мембраны клетки. Это стало возможным благодаря активному использованию молекулярно-биологических методов с использованием *S. cerevisiae* и применению полученных результатов для других эукариот, в том числе — для *A. thaliana* (Hall, Williams, 2003). В результате было выявлено, что в растительных клетках присутствуют различные семейства белков-переносчиков металлов, вовлеченных в поддержание гомеостаза металлов и играющих ключевую роль в возникновении устойчивости к ним. Также в настоящее время проводятся сравнительные исследования транскриптомов видов гипераккумуляторов и родственных им негипераккумулирующих видов, например, *A. halleri* и *A. thaliana* (Becher et al., 2004; Weber et al., 2004; Talke et al., 2006). Показано, что виды-гипераккумуляторы характеризуются повышенным уровнем транскрипции генов, кодирующих переносчики металлов. При этом установлено, что повышенный уровень транскрипции не связан с дивергенцией генов видов гипераккумуляторов и негипераккумуляторов, а обуславливается изменением на уровне регуляции генов, либо изменением количества их копий (Hanikenne et al., 2008; Oomen et al., 2009).

АТФ-азы тяжелых металлов (HMA)

АТФ-азы тяжелых металлов являются членами большого суперсемейства АТФ-аз P-типа, характерного для всех царств живого мира. Подсемейство P1B АТФаз делится на две группы: переносчики одно и двувалентных металлов (Hall, Williams et al., 2003). У *A. thaliana* подсемейство P1B включает в себя 8 различных белков (Mills et al., 2003). HMA2 и HMA4, расположенные в плазмаллеме, играют важную роль в ксилемном транспорте из корневой системы в наземную часть растения, как цинка, так и Cd (Kum et al., 2009) (рис. 1). Трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *HMA4* показали увеличенную устойчивость к Cd и аккумуляцию Cd в листьях (Verret et al., 2004). Недавние исследования показали, что белок HMA3, расположенный на вакуолярной мембране, принимает участие в транспорте Cd и цинка в вакуоль (рис. 1). Растения со сверхэкспрессией гена HMA3 характеризовались повышенной устойчивостью к Cd (Morel et al., 2009).

Недавно с использованием РНК-интерференции было показано, что белок HMA4 играет ведущую роль в гипераккумуляции цинка и устойчивости к цинку и Cd у *A. halleri*. Гипераккумуляция и гиперустойчивость к Cd у этого растения связаны с трипликацией гена *AhHMA4*, а также изменением цис-регуляции генов *AhHMA4*, в результате чего наблюдается их повышенная экспрессия у *A. halleri* по сравнению с *A. thaliana* (Hanikenne et al., 2008).

Nramp

Представители семейства белков Nramp участвуют в транспорте ряда двухвалентных металлов, включая железо и Cd. Nramp высококонсервативны, содержат 12 трансмембранных доменов с характерным «консенсусным транспортным мотивом» (Hall, Williams, 2003). Экспрессия генов *AtNramp1, AtNramp3* и *AtNramp4* в дрожжевых клетках вызывает повышенную чувствительность к Cd и накопление данного тяжелого металла. Показано, что дизрупция гена *AtNramp3* вызывает небольшое увеличение устойчивости к Cd, но в тоже время сверхэкспрессия этого гена вызывает гиперчувствительность к Cd у *A. thaliana* (Thomine et al., 2000). У *A. thaliana* экспрессия генов *AtNramp3* выявлена в проводящей системе корней, стеблей и листьев, что свидетельствует о том, что белок AtNramp3 может функционировать в переносе металлов на дальние расстояния. При этом показано, что он локализуется в вакуолярной мембране и может мобилизовать пул металлов из вакуоли (рис. 1) (Thomine et al., 2003). У гипераккумулятора *T. caerulescens* был выявлен повышенный уровень экспрессии генов *TcNramp3* и *TcNramp4* по сравнению с генами *AtNramp3* и *AtNramp4* у *A. thaliana*, хотя и те, и другие присутствуют в геноме в единичной копии (Oomen et al., 2009). В единичной копии эти гены также присутствовуют у родственных видов *T. minimum* и *T. praecox*, в то время как у *T. perfoliatum* — в двух копиях, а у *T. japonicum* были выявлено несколько копий этих генов. По всей видимости, повышенный уровень экспрессии генов *TcNramp3* и *TcNramp4* по сравнению с генами *AtNramp3* и *AtNramp4 A. thaliana* связан с различиями в цис- или трансрегуляторных элементах (Oomen et al., 2009).

CDF

Семейство белков CDF участвует в транспорте цинка, кобальта и, по всей видимости, Cd. Белки данного семейства содержат 6 трансмембранных доменов, катион-связывающий домен на C-конце, а также гистидин-богатый домен, вероятно участвующий в связывании цинка между 4-м и 5-м трансмембранными доменами (Hall, Williams, 2003). У *A. thaliana* гены, кодирующие CDF белки, были названы *ZAT* генами, они вовлечены в перенос Zn в вакуоль, обеспечивая тем самым его гомеостаз (Van der Zaal et al., 1999). У гипераккумулятора

никеля *T. goesingense* был выявлен ортолог *ZAT* гена *A. thaliana* — ген *TgMTP1*. Данный ген кодирует два транскрипта, один из которых — *TgMTP1t1* подвергается сплайсингу, а второй — *TgMTP1t2* — нет. Транскрипты различаются по последовательности гистидин-богатого домена, что, вероятно, обеспечивает специфичность этих переносчиков к разным металлам. Так, *TgMTP1t1*, экспрессируясь в дрожжевых клетках, способствует их устойчивости к Cd, кобальту и цинку, а *TgMTP1t2* к никелю (Persans et al., 2001).

ZIP

К настоящему моменту у *A. thaliana* выявлено около 15 белков ZIP семейства. ZIP белки содержат 8 трансмембранных доменов, при этом C и N концы расположены на внешней поверхности плазматической мембраны. Между 2-м и 3-м трансмембранными доменами располагается вариабельный участок, содержащий потенциальный металл-связывающий домен, обогащенный гистидином (Hall, Williams, 2003). У *A. thaliana* с использованием функциональной комплементации мутанта дрожжей, неспособного поглощать железо, был клонирован ген *AtIRT1*, кодирующий основной переносчик железа в корнях, при этом растения со сверхэкспрессией *AtIRT1* аккумулировали более высокие концентрации Cd и Zn по сравнению с растениями дикого типа (рис. 1) (Connolly et al., 2002; Vert et al., 2002). У *T. caerulescens* был клонирован ген переносчика *ZNT1*, гомолог *ZIP* генов, участвующий в транспорте цинка и Cd (Pence et al., 2000).

ABC переносчики

ABC переносчики представлены большим семейством мембранных белков, выполняющих различные транспортные функции. Для всех белков данного семейства характерны высокогидрофобный трансмембранный домен и цитоплазматический АТФ-связывающий домен (Hall, Williams et al., 2003). Ранее был упомянут гипотетический переносчик НМК и комплексов глутатиона в вакуоль — гомолог HMT1 *S. pombe*. Недавно были выявлены другие ABC переносчики, принимающие участие в детоксикации Cd в растительной клетке.

У *A. thaliana* путем анализа микрочипа, содержащего гены, кодирующие потенциальные ABC переносчики, было выявлено усиление экспрессии гена *AtPDR8* под воздействием ионов Cd^{2+}, Pb^{2+} или Cu^{2+}. В случае воздействия Cd^{2+} наблюдалось усиление уровня экспрессии *AtPDR8* в 1,5 раза в стеблях и в 1,8 раз в корнях. Трансгенные растения со сниженным уровнем экспрессии *AtPDR8* характеризовались резким снижением устойчивости к Cd^{2+} и Pb^{2+}. Напротив, трансгенные растения со сверхэкспрессией *AtPDR8* характеризовались повышенной устойчивостью к Cd^{2+} и Pb^{2+}. Устойчивость растений к тяжелым металлам коррелировала со снижением уровня Cd и свинца у растений со сверхэкспрессией *AtPDR8*. Анализ экспрессии репортерной конструкции GFP:AtPDR8 показал локализацию *AtPDR8* на плазматической мембране (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о действии AtPDR8 как важнейшего переносчика Cd из клетки (Kim et al., 2007).

Другой представитель ABC переносчиков — белок AtATM3, участвующий в поддержании гомеостаза железа в митохондриях (Kushnir et al., 2001). Было выявлено повышение уровня экспрессии гена *AtATM3* в 2,5 раза в корнях *A. thaliana* после 24 ч обработки трехнедельных растений 50 мкМ $CdCl_2$, сходные результаты наблюдались и при обработке растений 500 мкМ $Pb(NO_3)_2$ (Kim et al., 2006). Трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *AtATM3* показали повышенную устойчивость к Cd^{2+} и Pb^{2+}. Предполагается, что AtATM3 участвует в экспорте коньюгатов Cd с глутатионом из митохондрии в цитоплазму (рис. 1).

Другие переносчики

У *A. thaliana* был выявлен переносчик AtDTX1, локализованный на плазматической мембране, который осуществляет транспорт различных токсичных веществ (алкалоидов, антибиотиков) из цитоплазмы клетки, в том числе и Cd (рис. 1). Ген *AtDTX1* является представителем большого мультигенного семейства, имеющего сходство с бактериальным семейством генов, кодирующих переносчики многих лекарственных препаратов (MATE — multidrug and toxic compound extrusion) (Li et al., 2002).

Белок AtMHX, транспортирующий Cd в вакуоль, представлен в геноме в единичной копии (рис. 1) (Shaul et al., 1999). Позднее было показано, что трансгенные растения табака со сверхэкспресией гена *AtMHX*, в отличие от контрольных растений, проявляют некротические повреждения листьев при росте при повышенных концентрациях Mg^{2+}, Zn^{2+} и Cd^{2+}, что свидетельствует о том, что переносчик AtMHX может переносить *in vivo* ионы тяжелых металлов, в том числе Cd^{2+} (Berezin et al., 2008).

Недавно были получены данные, свидетельствующие о том, что механизмы устойчивости к Cd могут различаться у однодольных и двудольных растений (Kim et al., 2008). С использованием скрининга кДНК библиотеки *Triticum aestivum* на функциональную комплементацию мутанта дрожжей *Δycf1*, чувствительного к Cd, был выявлен ген *TaTM20*, предположительно кодирующий переносчик Cd. Дрожжи, трансформированные *TaTM20*, аккумулируют меньше Cd и выводят его быстрее, по сравнению с контролем, что определяет повышенную устойчивость трансформантов к Cd. Интересно отметить, что уменьшение содержания Cd в клетках дрожжей не сопровождается изменением в гомеостазе других двухвалентных элементов. Гомологи *TaTM20* были выявлены у других однодольных растений, но не были обнаружены у *A. thaliana*. Более того, эктопическая экспрессия *TaTM20* у *A. thaliana* не влияла на устойчивость растений к Cd и его аккумуляцию, что подтверждает уникальность механизма устойчивости, опосредованного *TaTM20*, для однодольных.

Другие белки

Совсем недавно была проведена трансформация *S. pombe* библиотекой кДНК *B. juncea* и отобран клон, проявляющий повышенную устойчивость к Cd, а также к другим металлам (мышьяку, меди и цинку) и окислителям (Blanvillain et al., 2009). Была предположена роль данного гена в адаптации растений к окислительному стрессу. Действительно, отобранный клон продуцировал меньшее количество супероксид радикалов, по сравнению с контролем. Выявленный ген *BjOXS3* (*B. juncea OXIDATIVE STRESS 3*) кодирует белок из 175 а. к., который принадлежит к семейству, включающему в себя 22 BjOXS3-подобных белка, которые были найдены только у растений. Все эти белки характеризуются наличием консервативного каталитического домена, обладающего потенциальной N-ацетилтрансферазной или тиолтрансферазной активностью. Важность данного домена для проявления устойчивости к Cd и другим стрессовым факторам была установлена с помощью направленного мутагенеза. Белок BjOXS3 был ко-локализован в ядре с гистоном H4. Это позволило предположить, что BjOXS3 вовлечен в ацетилирование гистона H4, изменяя тем самым стабильность нуклеосомы. Таким образом, предполагается, что BjOXS3 запускает специфичную экспрессию генов в ответ на стресс посредством реорганизации структуры хроматина (Blanvillain et al., 2009).

МикроРНК

Недавно было выявлено, что микроРНК играют важную роль в возникновении устойчивости растений к Cd. У *Medicago truncatula* выявлено шесть микроРНК, уровень экспрессии которых менялся после воздействия Cd. При этом уровень экспрессии miR393, miR171, miR319, miR529 увеличивался, в то время как miR166 и miR398 — снижался. Снижение уровня экспрессии miR398 связано с необходимостью усиления экспрессии генов *CSD1* и *CSD2*, кодирующих супероксиддисмутазы, вовлеченных в адаптацию растения к окислительному стрессу, вызванному Cd (Ding, Zhu, 2009). При исследованиях риса, *M. truncatula* и *Brassica napus* при действии Cd стресса были выявлены общие микроРНК: miR393 и miR171, ингибирующие действия генов-мишеней, участвующих в убиквитиновом пути передачи сигнала и связанных с передачей ауксинового сигнала и развитием цветка. Это свидетельствует о том, что ряд микроРНК играют важную роль в ответах растения, как на абиотические стрессы, так и в регуляции развития (Ding, Zhu, 2009).

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К Cd И ЕГО АККУМУЛЯЦИИ

Для изучения генетического контроля устойчивости растений к тяжелым металлам были использованы два подхода: анализ варьирования данных признаков в природных популяциях и экспериментальный мутагенез.

Генетический анализ популяций ряда высших растений показал, что основная устойчивость к некоторым металлам (мышьяк, медь, цинк) скорее всего, определяется одним или двумя основными генами и работой генов-модификаторов, определяющих уровень устойчивости (Schat et al., 1993; Smith, Macnair, 1998). Устойчивость к определенному металлу обычно контролируется геном (или генами), отличными от генов, определяющих устойчивость к другому металлу (Tilstone et al., 1997). Исследования природных популяций арахиса, гороха, кукурузы, пшеницы, риса, сои, ячменя, и гипераккумуляторов *B. juncea* и *T. caerulescens* выявили широкий полиморфизм по признакам основной и гиперустойчивости к Cd и его аккумуляции и гипераккумуляции (Arao, Ae, 2003; Bell et al., 1997; Belimov et al., 2003, 2007; Clarke et al., 1997; Liu et al., 2005; Roosens et al., 2003). Так, например, у гороха содержание Cd в сухой биомассе при выращивании растений в присутствии 5 мг Cd на кг$^{-1}$ варьировало между различными генотипами от 35 мг Cd на кг$^{-1}$ до 135 мг Cd на кг$^{-1}$, а индекс устойчивости варьировал от 54 до 100 % (Belimov et al., 2003).

Для твердой пшеницы было показано, что признак пониженного содержания Cd в зерне контролируется доминантной аллелью одного гена (Clarke et al., 1997), который локализован на хромосоме 5B (Grant et al., 2008). Линии с признаком пониженного содержания Cd характеризовались сниженным переносом Cd из корневой системы в наземную часть, что ограничивало его поступление в зерно (Chan, Hale, 2004). Было показано, что признак пониженного поглощения Cd не влияет на поглощение других элементов, хотя имеются указания, что он может быть связан с уменьшением аккумуляции в зерне цинка при дефиците цинка (Hart et al., 2005). Выполнение 10-летней программы по созданию сортов пшеницы с пониженным содержанием Cd в Канаде привело к регистрации новых сортов. Первый такого рода коммерческий сорт Strongfield начал возделываться в 2004 г. и в настоящее время занимает 25 % от площадей, занятых посевами твердой пшеницы в Канаде (Grant et al., 2008).

Однако до сих пор остается нерешенным вопрос, являются ли гиперустойчивость и гипераккумуляция Cd связанными событиями или независимыми. Для решения данной проблемы проводят исследование результатов направленных скрещиваний растений, различающихся по признакам устойчивости и аккумуляции тяжелых металлов, в том числе — межвидовых гибридов. Группой исследователей было получено поколение F_1 от скрещивания растения-гипераккумулятора *A. halleri* и не аккумулирующего вида *A. petraea* (Macnair et al., 1999), которое затем было скрещено с родительскими видами. Поколение Fb сильно варьировало по признаку аккумуляции цинка: были выявлены индивидуальные растения, аккумулирующие также мало цинка как *A. petraea*, также много как *A. halleri* и промежуточные варианты. Ге-

нетический анализ признака устойчивости показал, что устойчивость к меди, цинку и Cd, по видимому, определяется одним геном (Schat et al., 1996). Анализ поколения F_2, полученного от скрещивания *A. halleri* и *A. petraea* (Bert et al., 2003; Macnair et al., 1999), а также анализ поколений, полученных в результате скрещиваний различных популяций *T. caerulescens* (Zha et al., 2004), показали, что гипераккумуляция Cd и устойчивость к Cd не связаны между собой. Однако при исследовании Lombi с коллегами (Lombi et al., 2000) 4 различных популяций *T. caerulescens* были получены противоположные данные. В ходе исследований была выявлена разница между популяциями по способности накапливать Cd в побегах и по признаку устойчивости к данному тяжелому металлу. Растения из популяции, накапливающие наибольшее количество Cd, были также и наиболее устойчивыми к его токсическому действию. Таким образом, результаты данных исследования указывают на общий генетический контроль признаков гипераккумуляции Cd и гиперустойчивости к нему растений (Lombi et al., 2000).

Хотя экспериментальный мутагенез представляет собой эффективный метод изучения молекулярно-генетических механизмов, однако к настоящему времени описано только несколько мутантов растений с измененными чувствительностью к Cd или его аккумуляцией.

У растений мутанта *cad1–1 A. thaliana*, в отличие от дикого типа, на питательной среде с 0,6 мкМ Cd замедлялся рост, наблюдались хлороз листьев и выработка корнями коричневого пигмента (Howden, Cobbett, 1992). Предполагается, что коричневый пигмент — это результат образования металл-сульфидных комплексов. Особенности фенотипа данного мутанта были использованы для идентификации трех других аллельных мутаций *cad1*. Генетический анализ полученных мутантов показал, что повышенная чувствительность к Cd наследуется как моногенный рецессивный признак. Мутант *cad1–3* был получен с использованием химического мутагенеза ДЭБ (диэпоксибутан) (Dolezal, Cobbett, 1991). Мутанты *cad1–4* и *cad1–5* были получены с использованием ЭМС (этилметан-сульфоната). При сравнении полученных мутантов по чувствительности к Cd было установлено, что мутанты *cad1–3* и *cad1–4* чувствительны к концентрации Cd 0,3 мкМ, в то время как мутанты *cad1–1* и *cad1–5* — к 0,6 и 1,5 мкМ соответственно. С использованием высокоэффективной гель-фильтрации было показано, что у мутантов *cad1–1* и *cad1–3* снижена способность образовывать Cd-связывающие комплексы. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии выявило снижение способности *cad1* мутантов запасать фитохелатины. Содержание фитохелатинов, у каждого мутанта коррелировало с уровнем его чувствительности к Cd. Таким образом, проведенные эксперименты показали, что у мутантов по гену *cad1* снижена активность фитохелатинсинтазы (Howden et al., 1995a). Локус *CAD1* был локализован на 5-й хромосоме *A. thaliana*. Позиционное клонирование показало, что ген *CAD1* является выявленным ранее в процессе секвенирования генома *A. thaliana* геном *MRH10.11*. Показано, что мутации *cad1–1, cad1–4* и *cad1–5* — это транзиции, а мутация *cad1–3* — это трансверсия G–C → C–G. кДНК, полученная обратной транскрипцией данного участка, содержит открытую рамку считывания, кодирующую белок массой 55 кДа, содержащий 485 а.к. Экспрессия кДНК *CAD1* в клетках *E. coli* показала, что экстракты из этих клеток катализируют синтез фитохелатинов, активируемый тяжелыми металлами, что подтвердило, что ген *CAD1* кодирует фитохелатинсинтазу (Ha et al., 1999).

Во время исследований *cad1* мутантов, был выделен еще один мутант *A. thaliana*, чувствительный к Cd, — *cad2*. Генетический анализ показал, что чувствительность к Cd — моногенный рецессивный признак. В отсутствие Cd не было выявлено разницы в росте между мутантом *cad1–1*, *cad2* и диким типом. При концентрации Cd 6 мкМ дикий тип продолжал расти, в то время как у мутанта *cad1–1* наблюдалось снижение темпов роста уже при концентрации Cd 1 мкМ. Мутант *cad2* проявил промежуточный фенотип: ингибирование роста наблюдалось при концентрации Cd 3 мкМ, и не было выявлено при концентрации, критичной для *cad1–1* мутанта (Howden et al., 1995b).

У мутанта *cad2* снижена способность изолировать Cd. Уровень Cd-связывающих комплексов, формирующихся *in vivo*, у растений *cad2* был снижен по сравнению с диким типом. Аккумуляция фитохелатинов составляла порядка 10 % от их количества у дикого типа. Уровень глутатиона, субстрата для биосинтеза фитохелатинов, в тканях *cad2* мутанта был снижен до 15–30 % по сравнению с диким типом. Также был снижен уровень γ-глутамилцистеин-синтетазы. Уровень цистеина был вдвое выше, чем у растений дикого типа. Данные факты позволили предположить, что у мутанта был нарушен биосинтез глутатиона, а именно снижена активность γ-глутамилцистеин-синтетазы. Данное предположение подтвердилось биохимическими исследованиями *in vitro*, показавшими снижение активности данного фермента по сравнению с диким типом, в то время как активность глутатион-синтетазы не менялась (Howden et al., 1995b).

Локус *CAD2* был локализован на 4-й хромосоме и показал тесное сцепление с локусом *GSHA*, который кодирует γ-глутамилцистеин-синтетазу. Дальнейшими исследованиями было установлено, что ген *CAD2* содержит 15 интронов, размер которых варьирует от 77 до 359 п. о. Размер экзонов варьирует от 69 до 340 п. о. Нуклеотидная последовательность гена *GSHA cad2* мутанта содержит делецию 6 п. о. в 6-м экзоне (Cobbett et al., 1998).

Характеристика полученных мутаций показывает, что модификации в единичных генах существенно влияют на основную устойчивость к тяжелым металлам или на их накопление. Однако до недавнего времени не было описано

успешных экспериментов, в ходе которых был бы получен мутант с обеими измененными характеристиками.

Недавно у гороха был описан новый мутант, полученный после ЭМС мутагенеза исходной линии SGE, характеризующийся повышенным накоплением Cd и устойчивостью к токсичным концентрациям Cd (Tsyganov et al., 2007). Мутант SGECd^t был охарактеризован как имеющий моногенное наследование и рецессивное проявление фенотипа. Мутантный локус был локализован в VI группе сцепления гороха (Tsyganov et al., 2008). Биохимический анализ маркеров стресса (хитиназа, пероксидаза и пролин) показали, что у данного мутанта снижен уровень стрессового ответа на действие Cd. Установлено, что устойчивость мутанта SGECd^t к Cd не связана с процессами синтеза глутатиона и работой фитохелатинсинтазы. Таким образом, этот мутант одновременно аккумулирует Cd и является устойчивым к его токсическому действию и представляет собой новую и уникальную модель для изучения адаптаций растений к токсическим концентрациям тяжелых металлов (Tsyganov et al., 2007). Примечательно, что мутант способен как формировать клубеньки при более высоких концентрациях Cd, по сравнению с исходной линией, так и поддерживать их функциональную активность (Tsyganov et al., 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 10 лет наши представления о механизмах устойчивости растений к Cd и его аккумуляции значительно расширились. Исследовано распределение этих признаков между экотипами некоторых видов-гипераккумуляторов Cd и ценных для сельского хозяйства видов. Были выявлены различные классы белков, влияющие на проявление устойчивости к Cd. Было показано, что у растений-гипераккумуляторов Cd наблюдается повышенный уровень экспрессии генов, кодирующих переносчики металлов, который связан с изменением регуляции генов и количества их копий. Т. е., по всей видимости, при проявлении растением основной и гиперустойчивости к кадмию в основном используются одни и те же механизмы (за исключением синтеза фитохелатинов при основной устойчивости). Однако в случае гиперустойчивости ряд механизмов значительно активирован. Тем не менее, в этом направлении требуется проведение дальнейших исследований. Так, у растений до сих пор не выявлен ABC переносчик, вовлеченный в перенос комплексов Cd с фитохелатинами в вакуоль, хотя данный механизм рассматривается как главный в проявлении основной устойчивости. В то же время, было показано, что фитохелатины играют важную роль детоксикации Cd не только у растений, но и у животных. Достижения в генетике устойчивости растений к Cd позволили успешно реализовать в Канаде программу по селекции сортов твердой пшеницы с пониженным поглощением Cd. В настоящее время такие программы проводятся для риса и сои. Активное использование экспериментального мутагенеза является перспективным методом, стимулирующим генетические исследования в данной области. Расширение наших знаний о молекулярно-генетических механизмах устойчивости растений к Cd будет способствовать решению другой важной практической задачи — разработки новых перспективных технологий, основанных на использовании фиторемедиации для очистки почв, загрязненных тяжелыми металлами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была финансово поддержана: Федеральным агентством по науке и инновациям (государственный контракт № 02.740.11.0276), Федеральным агентством по образованию (государственные контракты № П290, П1746), РФФИ (08-04-01565-а; 08-04-90051-Бел_а), грантом Президента РФ (НШ-5399.2008.4), Администрацией Санкт-Петербурга (договор 368/08).

Литература

1. *Серегин И.,* 2001. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений // Усп. биол. химии. Т. 41. С. 283–300.
2. *Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М. и др.,* 2007. Устойчивость растений к тяжелым металлам. — Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 172 с.
3. *Цыганов В. Е., Заболотный А. И., Будкевич Т. А. и др.,* 2010. Влияние кадмия на развитие и функционирование клубеньков у лядвенца рогатого *(Lotus corniculatus* L.) и лядвенца японского *(Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen) // Ботаника (Исследования). Выпуск 38. С. 343–354.
4. *Arao T., Ae N.,* 2003. Genotypic variations in cadmium levels of rice grain // Soil Sci. Plant Nutr. Vol. 49. P. 473–479.
5. *Baker A. J. M.,* 1981. Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals // J. Plant Nutr. Vol. 3. P. 643–654.
6. *Becher M., Talke I., Krall L., Krämer U.,* 2004. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* // Plant J. Vol. 37. P. 251–268.
7. *Belimov A. A., Safronova V. I., Tsyganov V. E. et al.,* 2003. Genetic variability in tolerance to cadmium and accumulation of heavy metals in pea *(Pisum sativum* L.) // Euphytica. Vol. 131. P. 25–35.
8. *Belimov A., Safronova V., Demchinskaya S., Dzyuba O.,* 2007. Intraspecific variability of cadmium tolerance in hydroponically grown Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) seedlings // Acta Physiol. Plant. Vol. 29. P. 473–478.

9. *Bell M. J., McLaughlin M. J., Wright G. C., Cruickshank J.,* 1997. Inter- and intra-specific variation in accumulation of cadmium by peanut, soybean, and navy bean // Aust. J. Agr. Res. Vol. 48. P. 1151–1160.
10. *Berezin I., Mizrachy-Dagry T., Brook E., Mizrahi K.,* 2008. Overexpression of *AtMHX* in tobacco causes increased sensitivity to Mg^{2+}, Zn^{2+}, and Cd^{2+} ions, induction of V-ATPase expression, and a reduction in plant size // Plant Cell Rep. Vol. 27. P. 939–949.
11. *Bert V., Meerts P., Saumitou-Laprade P. et al.,* 2003. Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri* // Plant Soil. Vol. 249. P. 9–18.
12. *Blanvillain R., Kim J., Wu S., Lima A.,* 2009. OXIDATIVE STRESS 3 is a chromatin-associated factor involved in tolerance to heavy metals and oxidative stress // Plant J. Vol. 57. P. 654–665.
13. *Brooks R. R.,* 1998. Plants that hyperaccumulate heavy metals. Wallingfors: CAB Intl., 381 p.
14. *Callahan D. L., Baker A. J. M., Kolev S. D., Wedd A. G.,* 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants // J. Biol. Inorg. Chem. Vol. 11. P. 2–12.
15. *Chan D. Y., Hale B. A.,* 2004. Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation // J. Exp. Bot. Vol. 55 P. 2571–2579.
16. *Chen Y., He Y., Yang Y., Yu Y.,* 2003. Effect of cadmium on nodulation and N_2-fixation of soybean in contaminated soils // Chemosphere. Vol. 50. P781–787.
17. *Clarke J. M., Leisle D., Kopytko G. L.,* 1997. Inheritance of cadmium concentration in five durum wheat crosses // Crop Sci. Vol. 37. P. 1722–1726.
18. *Clemens S.,* 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis // Planta. Vol. 212. P. 457–486.
19. *Clemens S.,* 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants // Biochimie. Vol. 88. P. 1707–1719.
20. *Cobbett C. S., May M. J., Howden R., Rolls B.,* 1998. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ-glutamylcysteine synthetase // Plant J. Vol. 16. P. 73–78.
21. *Connolly E. L., Fett J. P., Guerinot M. L.,* 2002. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation // Plant Cell. Vol. 14. P. 1347–1357
22. *DalCorso V., Farinati S., Maistri S., Furini A.,* 2008. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression // J. Integr. Plant Biol. Vol. 50. P. 1268–1280.
23. *Ding Y., Zhu Ch.,* 2009. The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis // Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 386. P. 6–10.
24. *Dolezal O., Cobbett C.,* 1991. Arabinose kinase-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. Vol.96. P. 1255–1260.
25. *Dominguez-Solís J., Gutierrez-Alcalá G., Vega J., Romero L.,* 2001. The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance // J. Biol. Chem. Vol. 276. P. 9297–9302.
26. *Ebbs S., Lau I, Ahner B., Kochian L.,* 2002. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* // Planta. Vol. 214. P. 635–640.
27. *Fusconi A., Gallo C., Camusso W.,* 2007. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L. Cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution // Mut. Res. Vol. 632. P. 9–19.
28. *Grant C., Clarke J., Duguidcand S., Chaney R. L.,* 2008. Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation // Sci. Total Environ. Vol. 390. P. 301–310.
29. *Guyon V., Astwood J., Garner E., Dunker A.,* 2000. Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in petunia // Plant Physiol. Vol. 123. P. 699–710.
30. *Ha S., Howden R., Dietrich W., Bugg S.,* 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe* // Plant Cell. Vol. 11. P. 1153–1163.
31. *Hall J. L., Williams L. E.,* 2003. Transition metal transporters in plants. J. Exp. Bot. Vol. 54. P. 2601–2613.
32. *Hanikenne M., Talke I. N., Haydon M. J. et al.,* 2008. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4* // Nature. Vol. 453. P. 391–395.
33. *Hart J. J., Welch R. M., Norvell W. A. et al.,* 2005. Zinc effects on cadmium accumulation and partitioning in near-isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium concentration // New Phytol. Vol. 167. P. 391–401.
34. *Howden R., Cobbett C. S.,* 1992. Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. Vol. 100. P. 100–107.
35. *Howden R., Andersen C. R., Goldsbrough P. B., Cobbett C. S.,* 1995a. A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. Vol. 107. P. 1067–1073.
36. *Howden R., Goldsbrough P. B., Andersen C. R., Cobbett C. S.,* 1995b. Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient // Plant Physiol. Vol. 107. P. 1059–1066.
37. *Kim D., Bovet L., Kushnir S., Noh E.,* 2006. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis* // Plant Physiol. Vol. 140. P. 922–932.
38. *Kim D., Bovet L., Maeshima M., Martinoia E.,* 2007. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance // Plant J. Vol. 50. P. 207–218.
39. *Kim Y., Kim D., Shim D., Song W.,* 2008. Expression of the novel wheat gene *TM20* confers enhanced cadmium

tolerance to bakers' yeast // J. Biol. Chem. Vol. 283. P. 15893–15902.
40. *Krotz R. M., Evangelou B. P., Wagner G. J.,* 1989. Relationships between cadmium, zinc, Cd-binding peptide, and organic acid in tobacco suspension cells // Plant Physiol. Vol. 91. P. 780–787.
41. *Kum Ch., Wong E., Cobbett Ch.,* 2009. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana* // New Phytol. Vol. 181. P. 71–78.
42. *Kushnir S., Babiychuk E., Storozhenko S., Davey M.,* 2001. A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Sta1* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis mutant starik* // Plant Cell. Vol. 13. P. 89–100.
43. *Lane T. W., Saito M. A., George G. N. et al.,* 2005. A cadmium enzyme from a marine diatom // Nature. Vol. 435. P. 42.
44. *Li L., He Z., Pandey G. K. et al.,* 2002. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification // J. Biol. Chem. Vol. 277. P. 5360–5368.
45. *Liu J., Zhu Q., Zhang Z. et al.,* 2005. Variations in cadmium accumulation among rice cultivars and types and the selection of cultivars for reducing cadmium in the diet // J. Sci. Food Agr. Vol. 85. P. 147–153.
46. *Liu M. Q., Yanai J., Jiang R. F. et al.,* 2008. Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*? // Chemosphere. Vol. 71. P. 1276–1283.
47. *Lombi E., Zhao F. J., Dunham SJ., McGrath S. P.* 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense* // New Phytol. Vol. 145. P. 11–20.
48. *Macnair M. R., Bert V., Huitson S. B. et al.,* 1999. Zinc tolerance and hyperaccumulatin are genetically independent characters // Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci. Vol. 266. P. 2175–2179.
49. *Matsuda T., Kuramata M., Takahashi Y. et al.,* 2009. A novel plant cysteine-rich peptide family conferring cadmium tolerance to yeast and plants // Plant Sign. Behav. Vol. 4:5. P. 419–421.
50. *Mills R., Krijger G., Baccarini P. et al.,* 2003. Functional expression of *AtHMA4*, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass // Plant J. Vol. 35. P. 164–176.
51. *Morel M., Crouzet J., Gravot A.,* 2009. AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis* // Plant Physiol. Vol. 149. P. 894–904.
52. *Oomen R. J. F. J., Wu J., Lelievre F. et al.,* 2009. Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* // New Phytol. Vol. 181. P. 637–650.
53. *Ortiz D. F., Kreppel L., Speiser D. M. et al.,* 1992. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter // EMBO J. Vol. 11. P. 3491–3499.
54. *Palmiter R. D.,* 1998. The elusive function of metallothioneins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 95. P. 8428–8430.
55. *Pan A., Yang M., Tie F. et al.* 1994. Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants // Plant Mol. Biol. Vol. 24. P. 341–351.
56. *Peer W. A., Baxter I. R., Richards E. L., Freeman J. L., Murphy A. S.,* 2005. Phytoremediation and hyperaccumulator plants // Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification / Eds. M. J. Tamás, E. Martinoia, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. P. 299–340.
57. *Pence N. S., Larsen P. B., Ebbs S. D.,* 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 97. P. 4956–4960.
58. *Persans M., Nieman K., Salt D.,* 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 98. P. 9995–10000.
59. *Prévéral S., Gayet L., Moldes C. et al.,* 2009. A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans. Heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides // J. Biol. Chem. Vol. 284. P. 4936–4943.
60. *Reese R., Wagner G.,* 1987. Effects of buthionine sulfoximine on Cd-binding peptide levels in suspension-cultured tobacco cells treated with Cd, Zn, or Cu // Plant Physiol. Vol. 84. P. 574–577.
61. *Rivera-Becerril F., Calantzis C., Turnau K. et al.,* 2002. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes // J. Exp. Bot. Vol. 53. P. 1177–1185.
62. *Rivera-Becerril F., van Tuinen D., Martin-Laurent F. et al.,* 2005. Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress // Mycorrhiza. Vol. 16. P. 51–60.
63. *Rivetta A., Negrini N., Cocucci M.,* 1997. Involvement of Ca^{2+}-calmodulin in Cd^{2+} toxicity during the early phases of radish *(Raphanus sativus* L.*)* seed germination // Plant Cell Environ. Vol. 20. P. 600–608.
64. *Roosens N., Verbruggen N., Meerts P. et al.,* 2003. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from Western Europe // Plant Cell Environ. Vol. 26. P. 1657–1672.
65. *Sanita di Toppi L., Gabbrielli R.,* 1999. Response to cadmium in higher plants // Environ. Exp. Bot. Vol. 41. P. 105–130.
66. *Sanjaya P., Hsiao P., Su R., Ko S.,* 2008. Overexpression of *Arabidopsis thaliana tryptophan synthase beta 1 (AtTSB1)* in *Arabidopsis* and tomato confers tolerance to cadmium stress // Plant Cell Environ. Vol. 31. P. 1074–1085.

67. *Schat H., Kuiper E., Ten Bookum W. M., Vooijs R.,* 1993. A general model for the genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*: evidence from crosses between plants from different tolerant populations // Heredity. Vol. 70. P. 142–147.
68. *Schat H., Vooijs R., Kuiper E.,* 1996. Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris* // Evolution. Vol. 50. P. 1888–1895.
69. *Shaul O., Hilgemann D. W., de-Almeida-Engler J. et al.,* 1999. Cloning and characterization of a novel Mg^{2+}/H^{+} exchanger // EMBO J. Vol. 18. P. 3973–3980.
70. *Singh O., Labana S., Pandey G. et al.,* 2003. Phytoremediation: an overview of metabolic ion decontamination from soil // Appl. Microb. Biotech. Vol. 61. P. 405–412.
71. *Smith S. E., Macnair M. R.,* 1998. Hypostatic modifiers cause variation in degree of copper tolerance in *Mimulus guttatus* // Heredity. Vol. 80. P. 760–768.
72. *Song W-Y., Martinoia E., Lee J. et al.,* 2004. A novel family Cys-rich membrane proteins mediates cadmium resistance in *Arabidopsis* // Plant Physiol. Vol. 135. P. 1027–1039.
73. *Suzuki N., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H.,* 2002. Functional characterization of a heavy metal binding protein CdI19 from *Arabidopsis* // Plant J. Vol. 32. P. 165–173.
74. *Talke I. N., Hanikenne M., Krämer U.,* 2006. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* // Plant Physiol. Vol. 142. P. 148–167.
75. *Thomine S., LelieÁvre F., Debarbieux E. et al.,* 2003. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency // Plant J. Vol. 34. P. 685–695.
76. *Thomine S., Wang R., Ward J. M. et al.,* 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 97. P. 4991–4996.
77. *Tilstone G., Macnair M., Smith S.,* 1997. Does copper tolerance give cadmium tolerance in *Mimulus guttatus*? // Heredity. Vol. 79. P. 445–452.
78. *Tommey A. M., Shi J., Lindsay W. P. et al.,* 1991. Expression of the pea gene *PsMTa* in *E. coli* — metal binding properties of the expressed protein // FEBS Letters. Vol. 292. P. 48–52.
79. *Tsyganov V., Belimov A., Borisov A. et al.,* 2007. A chemically induced new pea *(Pisum sativum)* mutant SGECd^{t} with increased tolerance to, and accumulation of, cadmium // Ann. Bot. Vol. 99. P. 1–11.
80. *Tsyganov V., Zhernakov A., Kulaeva O. et al.,* 2008. Cadmium influence on legume-*Rhizobium* symbioses. In: Proceedings of 8th European Nitrogen Fixation Conference. Gent, Belgium. August 30 – September 3, P. 201.
81. *Ueno D., Ma J. F., Iwashita T. et al.,* 2005. Identification of the form of Cd in the leaves of a superior Cd accumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* using Cd-NMR // Planta. Vol. 221. P. 928–936.
82. *Van der Zaal B. J., Neuteboom L. W., Pinas J. E. et al.,* 1999. Over-expression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation // Plant Physiol. Vol. 119. P. 1047–1055.
83. *Verbruggen N., Hermans Ch., Schat H.,* 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants // New Phytol. Vol. 181. P. 759–776
84. *Verret F., Gravot A., Auroy P. et al.* 2004. Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance // FEBS Letters. Vol. 576. P. 306–312.
85. *Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp F.,* 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth // Plant Cell. Vol. 14. P. 1223–1233.
86. *Vatamaniuk O. K., Bucher E. A., Sundaram M. V., Rea P. A.,* 2005. CeHMT-1, a putative phytochelatin transporter, is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans* // J. Biol. Chem. Vol. 280. P. 23684–23690.
87. *Vatamaniuk O. K., Bucher E. A., Ward J. T., Rea P. A.,* 2001. A new pathway for heavy metal detoxification in animals: phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans* // J. Biol. Chem. Vol. 276. P. 20817–20820.
88. *Weber M., Harada E., Vess C. et al.,* 2004. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotinamine synthase, a zip transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors // Plant J. Vol. 37. P. 269–281.
89. *Zha H. G., Jiang R. F., Zhao E. J. et al.,* 2004. Co-segregation analysis of cadmium and zinc accumulation in *Thaspi caerulescen*s interecotypic crosses // New Phytol. Vol. 163. P. 299–312.
90. *Zhigang A., Cuijie L., Yuangang Z. et. al.,* 2006. Expression of *BjMT2*, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings // J. Exp. Bot. Vol. 57. P. 3575–3582.
91. *Zimeri A. M., Dhankher O. P., McCaig B., Meagher R. B.,* 2005. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation // Plant Mol. Biol. Vol. 58. P. 839–855.
92. *Zornoza P., Vazquez S., Esteban E. et al.,* 2002. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity // Plant Physiol. Biochem. Vol. 40. P. 1003–1009.

MOLECULAR-GENETIC BASIS OF HIGHER PLANTS TOLERANCE TO, AND ACCUMULATION OF, CADMIUM

Kulaeva O. A., Tsyganov V. E.

❀ **SUMMARY: Cadmium (Cd) is one of the most wide-ranged and dangerous pollutants for all living organisms, including plants. At present time the intensive studies of mechanisms of Cd accumulation in plant tissues and plant tolerance to its toxic influence are performed. Data about variation of Cd tolerance and accumulation traits in natural populations of hyperaccumulators species as well as important crops were obtained. A series of mutants with changed sensitivity to Cd was obtained. In recent decade several classes of proteins involving in cell responses to Cd ions were revealed. An important role of microRNA in plant adaptation to Cd was recently demonstrated. Studies of molecular-genetic mechanisms of Cd accumulation and plant tolerance to it are theoretical basis for development of phytoremediation technologies of soil contaminated with heavy metals and breeding of crop varieties with decreased Cd accumulation.**

❀ **KEY WORDS:** genetic analysis of cadmium tolerance; hyperaccumulation; metal transporters; metallothioneins; phytochelatins; microRNA; phytoremediation; transcriptomic analysis; gene overexpression; RNA intereference.

❀ Информация об авторах

Кулаева Ольга Алексеевна — инженер-исследователь.
ГНУ Всероссийский научно–исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, лаборатория молекулярной и клеточной биологии.
196608 Санкт-Петербург, Пушкин 8, шоссе Подбельского д. 3
E-mail: koa1983@yandex.ru.

Цыганов Виктор Евгеньевич — заведующий лабораторией молекулярной и клеточной биологии, кандидат биологических наук.
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: viktor_tsyganov@arriam.spb.ru.

Kulaeva Olga Aleksseevna — engineer.
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.
E-mail: koa1983@yandex.ru.

Tsyganov Viktor Evgenevich — head of the laboratory.
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.
E-mail: Viktor_Tsyganov@arriam.spb.ru.

УДК 579.25:576.851.155

© Н. И. Воробьев,
Н. А. Проворов

Государственное научное учреждение ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА НА ПОВЫШЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ИНТЕГРИРОВАННОСТИ ПАРТНЕРОВ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

❀ **В результате моделирования коэволюции клубеньковых бактерий и бобовых растений предложен математический критерий (индекс) функциональной интегрированности симбиоза (ФИС), основанный на анализе матриц ковариаций частот генотипов партнеров при флуктуациях системных параметров. Установлена положительная корреляция ФИС с экологической эффективностью симбиоза (его влиянием на семенную продуктивность растений) и отрицательная корреляция с уровнями популяционного разнообразия партнеров. Выявленные зависимости позволяют объяснить возрастание структурно-функциональной целостности симбиоза, характерное для его макроэволюции, естественным отбором на повышение эффективности взаимодействия партнеров.**

❀ **Ключевые слова**:
мутуалистический симбиоз; клубеньковые бактерии; математическое моделирование; ковариационные матрицы; корреляционный анализ; интегрированность биосистем; популяционный полиморфизм; естественный отбор; эволюция симбиоза.

Поступила в редакцию 03.12.2009.
Принята к публикации 12.05.2010.

ВВЕДЕНИЕ

Мутуалистический симбиоз является результатом кооперативных адаптаций неродственных организмов к меняющимся, в первую очередь — к неблагоприятным условиям внешней среды. Этот тип взаимодействия характеризуется глубокой генетической интеграцией партнеров, определяющей развитие у них новых, адаптивно значимых морфофизиологических признаков (Проворов, 2001; Тихонович, Проворов, 2003, 2009). На примере микробно-растительных взаимодействий показано, что по степени организованности (целостности) мутуалистические симбиозы существенно превосходят антагонистические симбиозы (паразитарные системы) (Tikhonovich, Provorov, 2009). Логично предположить, что повышение уровня структурно-функциональной интегрированности симбиоза является необходимым условием достижения им высокой экологической эффективности, определяемой биологической продуктивностью партнеров.

Известно, что в ходе эволюции N_2-фиксирующего бобово-ризобиального симбиоза происходило существенное возрастание его структурно-функциональной организованности: переход от межклеточной к внутриклеточной локализации N_2-фиксирующих бактерий (становление механизмов их эндоцитоза, приводящего к формированию стабильных симбиосом, а у некоторых видов ризобий — и к дифференцировке в нежизнеспособные бактероиды); усложнение механизмов инфицирования бактериями корней (от «примитивного» проникновения через разрывы эпидермиса к «эволюционно продвинутому» захвату ризобий корневыми волосками); совершенствование путей ассимиляции фиксированного азота (Проворов и др., 2002; Sprent, 2007). Одновременно с возрастанием структурно-функциональной целостности в этих биосистемах наблюдается усиление специфичности (избирательности) взаимодействия растительных и бактериальных генотипов, которое также говорит о повышении организованности биосистемы. Целью данной статьи является формулировка количественного критерия, характеризующего уровень функциональной интегрированности партнеров, и анализ ее взаимосвязи с адаптивно значимыми свойствами симбиоза — с его экологической эффективностью и разнообразием партнеров.

1. МОДЕЛИРОВАНИЕ МИКРОЭВОЛЮЦИИ ПОЛИМОРФНОЙ СИМБИОСИСТЕМЫ

Как и ранее (Воробьев, Проворов, 2008; Проворов, Воробьев, 2009; Provorov, Vorobyov, 2008), мы представили микроэволюцию бобово-ризобиальной симбиосистемы в форме циклического процесса, каждый (t-й) цикл которого разделен на 4 этапа: 1) возникновение новых генотипов (мутантов) бактерий с измененными симбиотическими свойствами, происхо-

Таблица 1

Тест-изменения (ТИ), внесенные в исходную схему взаимодействия бактерий с растительным генотипом G1

ТИ	Изменения характеристик поведения бактерий в симбиотических субнишах растительного генотипа G1*	Семенная продуктивность**
ТИ1	Изменено в 3 раза соотношение объемов колонизации бактериями симбиотических субниш: для клубеньковой субниши объем повышен (до $N_{21} = 60\times10^{13}$), для ризосферной субниши снижен (до $R_{21} = 5\times10^{12}$).	+1,5 (50,6)
ТИ2	Исключен из колонизации клубеньков не фиксирующий N_2 штамм P (c0 = 0)	+52,1 (63,4)
ТИ3	Исключен из колонизации клубеньков штамм M2 с низкой N_2-фиксирующей активностью (c2 = 0)	+27,4 (62,0)
ТИ4	Исключен из колонизации клубеньков штамм M1 с высокой N_2-фиксирующей активностью (c1 = 0)	−42,2 (33,9)
ТИ5	Изменены N_2-фиксирующие активности всех штаммов-мутуалистов (утрачена у M2, повышена у M1 и M3 ($b_{11} = 0,6$; $b_{12} = 0$; $b_{13} = 0,4$)	0 (50,0)
ТИ6	То же (утрачена у M1, повышена у M2 и M3 ($b_{11} = 0$; $b_{12} = 0,34$; $b_{13} = 0,66$)	0 (50,0)
ТИ7	Повышена в 1,5 раза N_2-фиксирующая активность всех штаммов-мутуалистов ($b_{11} = 0,75$; $b_{12} = 0,25$; $b_{13} = 0,5$)	+82,0 (71,3)
ТИ8	Повышена интенсивность инокуляции клубеньковой субниши наиболее активным азотфиксатором M1 (n11 = 0,3)	+23,7 (58,3)

* В скобках указаны системные параметры, величины которых изменены по сравнению с представленными в Приложении (табл. П3, П6) базовыми значениями, принятыми для растительного генотипа G1 (взаимодействие бактерий с генотипом G2 соответствует исходной схеме, согласно которой все штаммы участвуют в колонизации клубеньковой субниши).

** Указаны отклонения (в %) от семенной продуктивности растительного генотипа G1, развиваемой при реализации исходной схемы развития ($4,05\times10^9$ семян); в скобках приведена доля семян генотипа G1 в общем семенном пуле растительной популяции (для исходной схемы она равна 50%).

дящее в почвенной нише; 2) инокуляция бактериями симбиотических (ризосферных, клубеньковых) ниш, предоставляемых растениями; 3) колонизация бактериями инокулированных ниш и формирование растениями семян; 4) выход бактерий из ризосферы и клубеньков, и дифференциальное отмирание штаммов в почве, которое приводит к установлению новой генетической структуры симбиосистемы, являющейся начальной для (t+1)-го цикла (Приложение, табл. П1–П5).

Предлагаемая математическая модель описывает систему, состоящую из диморфной растительной популяции (генотипы G1, G2) и полиморфной бактериальной популяции, включающей родительский штамм (P), образующий не фиксирующие N_2 клубеньки с обоими растительными генотипами, и три его N_2-фиксирующих мутанта (M1, M2, M3). Мутант M1 проявляет высокую N_2-фиксирующую активность с растительным генотипом G1, но низкую — с G2 (мутуалистический симбионт, специфичный для растительного генотипа G1); M2 проявляет высокую N_2-фиксирующую активность с растительным генотипом G2, но низкую — с генотипом G1 (специфичный симбионт генотипа G2); M3 проявляет промежуточный уровень N_2-фиксирующей активности с обоими растительными генотипами (неспецифичный симбионт).

Учитывая, что инокуляция ризобиями обычно повышает семенную продуктивность растений (Provorov et al., 1998), мы вычисляли эффективность мутуалистического симбиоза (ЭМС) по предложенной ранее (Воробьев, Проворов, 2008) формуле:

$$\text{ЭМС} = \frac{P_{31.\infty} + P_{32.\infty}}{\alpha_\infty \times P_{21} + (1 - \alpha_\infty) \times P_{22}} \quad (1),$$

где: $P_{31.\infty}$ и $P_{32.\infty}$ — количества семян растительных генотипов G1 и G2, α_∞ — частота генотипа G1 в финальном ($t\to\infty$) состоянии системы (при вычислениях мы считали, что t-й микроэволюционный цикл может рассматриваться как финальный, если частоты бактериальных и растительных генотипов на t-м и (t−1)-м циклах различаются не более, чем на 10^{-6}); P_{21} и P_{22} — максимальные количества семян, формируемых генотипами G1 и G2 при 100%-х частотах N_2-фиксирующих бактерий в их клубеньковых субнишах (табл. П4).

Для характеристики полиморфизма бактериальной и растительной популяций использовали дисперсионные коэффициенты разнообразия (Nei, 1978).

2. МАТЕМАТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ИНТЕГРИРОВАННОСТИ СИМБИОЗА

Для того, чтобы изучить факторы, влияющие на интегрированность симбиоза (согласованность реакций его компонентов на изменения условий среды), мы ввели в исходную схему взаимодействия восемь тест-изменений (ТИ1...ТИ8, табл. 1), затрагивающих взаимодействие бактерий с растительным генотипом G1.

Таблица 2

Параметры бобово-ризобиального симбиоза при различных схемах взаимодействия партнеров*

Схема взаимодействия партнеров**	α_t	Частоты штаммов в бактериальной популяции				ЭМС	Индексы разнообразия партнеров		Индексы ФИС	
		P	M1	M2	M3		HM	HP	In_{PM}	In_M
Исходная схема	0,500	0,268	0,244	0,244	0,244	0,270	0,999	1,000	0,238	0,216
ТИ1	0,503	0,262	0,246	0,246	0,246	0,271	0,999	1,000	0,241	0,217
ТИ2	0,581	0,097	0,301	0,301	0,301	0,324	0,961	0,929	0,282	0,245
ТИ3	0,573	0,311	0,308	0,073	0,308	0,277	0,943	0,942	0,456	0,543
ТИ4	0,401	0,301	0,117	0,291	0,291	0,231	0,967	0,896	0,320	0,362
ТИ5	0,500	0,268	0,244	0,244	0,244	0,270	0,999	1,000	0,241	0,216
ТИ6	0,500	0,268	0,244	0,244	0,244	0,270	0,999	1,000	0,211	0,216
ТИ7	0,633	0,268	0,244	0,244	0,244	0,344	0,999	0,819	0,236	0,216
ТИ8	0,550	0,245	0,313	0,221	0,221	0,287	0,992	0,973	0,254	0,236
ТИ2+ТИ3	0,687	0,077	0,438	0,047	0,438	0,376	0,813	0,668	0,817	0,899
ТИ2+ТИ4	0,522	0,119	0,083	0,399	0,399	0,267	0,884	0,995	0,684	0,724
ТИ2+ТИ3+ТИ5	0,742	0,064	0,450	0,036	0,450	0,445	0,789	0,502	0,855	0,935
ТИ2+ТИ4+ТИ6	0,742	0,064	0,036	0,450	0,450	0,445	0,789	0,502	0,848	0,934
ТИ1+ТИ2+ТИ3	0,689	0,074	0,440	0,046	0,440	0,377	0,810	0,665	0,830	0,908
ТИ1+ТИ2+ТИ4	0,522	0,116	0,401	0,082	0,401	0,267	0,813	0,995	0,662	0,738
ТИ1+ТИ2+ТИ3 +ТИ5	0,743	0,063	0,452	0,035	0,452	0,447	0,785	0,498	0,866	0,941
ТИ1+ТИ2+ТИ4 +ТИ6	0,743	0,063	0,035	0,452	0,452	0,447	0,785	0,498	0,859	0,940
ТИ1+ТИ2+ТИ3 +ТИ5+ТИ7+ТИ8	0,849	0,036	0,554	0,018	0,392	0,701	0,718	0,201	0,908	0,977
ТИ1+ТИ2+ТИ4 +ТИ6+ТИ7+ТИ8	0,830	0,040	0,021	0,551	0,388	0,632	0,727	0,249	0,885	0,968

* Приведены финальные величины параметров, достигаемые при неограниченном возрастании числа микроэволюционных циклов ($t \to \infty$). Частота генотипа G1 в растительной популяции (α_t) определена на конец 2-го этапа t-го микроэволюционного цикла, частоты бактериальных генотипов — на начало цикла. Индексы популяционного разнообразия бактерий и растений (HM и HP) определяли по формуле: $H = (1 - \Sigma p_i^2) \times [n/(n-1)]$, где p_i — частота i-го генотипа, n — общее число генотипов (Nei, 1978). Эффективность мутуалистического симбиоза (ЭМС) определяли по формуле (1), индексы функциональной интегрированности симбиоза (ФИС) — по формуле (2).

** Тест-изменения (ТИ) исходной схемы развития симбиоза представлены в таблице 1.

Предложенные ТИ изменяют соотношение объемов колонизации бактериями ризосферной и клубеньковой субниш (ТИ1), исключают из колонизации клубеньковой ниши определенные штаммы ризобий (ТИ2–ТИ4), одновременно изменяют активность симбиотической N_2-фиксации у всех трех мутантов (ТИ5–ТИ7), а также повышают интенсивность инокуляции клубеньковой ниши растений генотипа G1 высокоэффективным в симбиозе с ними (специфичным) симбионтом M1 (ТИ8). В результате мы сформировали 18 симбиосистем, отличающиеся от исходной системы единичными и комбинированными ТИ (табл. 2).

При оценке функциональной интегрированности симбиоза (ФИС) мы использовали коэффициенты ковариации частот компонентов симбиоза (генотипов партнеров), индуцируемые при воздействии внешних факторов. Эти воздействия имитировали малыми (1%) увеличениями базовых значений системных параметров (табл. П6). Математическая модель рассматриваемой симбиосистемы представляет собой систему нелинейных итерационных уравнений (табл. П1...П5), для преобразования которой к квазилинейной системе осуществляется варьирование параметров вблизи базовых значений. Ее исследование показало, что 1%-е и меньшие изменения отвечают условию квазилинеаризации наших уравнений. Полученные данные позволяют вычислять матрицы ковариаций частот компонентов для симбиоза в це-

лом ($Cv_{Г1,\ М1,\ М2,\ М3}$) и для бактериальной популяции ($Cv_{М1,\ М2,\ М3}$):

$$\mathbf{Cv}_{Г1,М1,М2,М3} = \begin{bmatrix} Cv_{Г1,Г1} & Cv_{Г1,М1} & Cv_{Г1,М2} & Cv_{Г1,М3} \\ Cv_{Г1,М1} & Cv_{М1,М1} & Cv_{М1,М2} & Cv_{М1,М3} \\ Cv_{Г1,М2} & Cv_{М1,М2} & Cv_{М2,М2} & Cv_{М2,М3} \\ Cv_{Г1,М3} & Cv_{М1,М3} & Cv_{М2,М3} & Cv_{М3,М3} \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{Cv}_{М1,М2,М3} = \begin{bmatrix} Cv_{М1,М1} & Cv_{М1,М2} & Cv_{М1,М3} \\ Cv_{М1,М2} & Cv_{М2,М2} & Cv_{М2,М3} \\ Cv_{М1,М3} & Cv_{М2,М3} & Cv_{М3,М3} \end{bmatrix}$$

где $Cv_{k1.k2} = \sum_{j=1}^{N}\left(C_{k1.j} - M_{k1}\right)\cdot\left(C_{k2.j} - M_{k2}\right)$ — ковариация частот k1-го и k2-го компонентов;

$$M_{k1} = \frac{1}{N}\cdot\sum_{j=1}^{N} C_{k1.j}\ ;\ M_{k21} = \frac{1}{N}\cdot\sum_{j=1}^{N} C_{k2.j}\ ;$$

где N — число системных параметров, которые подвергались 1%-му увеличению; $C_{k1.j}$,$C_{k2.j}$ — отношения изменений финальных (при $t\to\infty$) частот компонентов k1 и k2 к вызвавшему их 1%-му увеличению j-го системного параметра (селективные ответы компонентов биосистемы)*.

Полученные матрицы $Cv_{Г1,\ М1,\ М2,\ М3}$, $Cv_{М1,\ М2,\ М3}$ обладают собственными значениями $\Lambda_{Г1,\ М1,\ М2,\ М3} = \{\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4\}$, $\Lambda_{М1,\ М2,\ М3} = \{\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3\}$, характеризующими распределение общей дисперсии селективных ответов компонентов симбиоза по ортогональным факторам в пространстве этих реакций (Кулаичев, 2006; рис. 1). Если адаптивные реакции компонентов характеризуются максимальной согласованностью, то только одно из собственных значений матрицы будет больше нуля, а остальные — равны нулю. При полном отсутствии согласованности адаптивных реакций собственные значения матрицы будут одинаковыми. Учитывая это, мы вычисляли индексы ФИС (In) по формуле:

$$In = \frac{L\cdot\sum_{m=1}^{L}\left(\frac{\lambda_m}{S}\right)^2 - 1}{L-1},\quad S = \sum_{m=1}^{L}\lambda_m, \qquad (2)$$

где L — количество собственных значений матриц ковариации, которое равно числу компонентов биосистемы (рангу матриц) для всей симбиосистемы (In_{PM} для матрицы $Cv_{Г1,\ М1,\ М2,\ М3}$; L = 4), либо для бактериальной популяции (In_M для матрицы $Cv_{М1,\ М2,\ М3}$; L = 3). По аналогии с коэффициентами корреляции, будем считать, что ФИС является высокой при $0{,}7 \le In \le 1{,}0$, средней при $0{,}5 \le In < 0{,}7$ и низкой при $In < 0{,}5$ (рис. 1).

Приведенная методика расчета индексов ФИС является независимой от вычислений ЭМС и показателей генетической структуры симбиосистемы (частоты генотипов партнеров, уровни их популяционного разнообразия), что позволяет давать эволюционные интерпретации выявляемым между ними коррелятивным связям.

3. СВЯЗЬ ИНТЕГРИРОВАННОСТИ СИМБИОСИСТЕМЫ С ЕЕ АДАПТИВНО ЗНАЧИМЫМИ СВОЙСТВАМИ

Изучение 19 схем развития симбиосистем (исходной и имеющих различные ТИ) показало, что они широко варьируют по ЭМС, показателям генетической структуры популяции и по индексам ФИС (табл. 2). Как и следовало ожидать, ЭМС возрастает при запрете на колонизацию клубеньковой субниши растительного генотипа G1 не фиксирующим N_2 (P) или слабо фиксирующим N_2 (M2) штаммами (ТИ2, ТИ3), однако снижается при запрете на колонизацию этой субниши активно фиксирующим N_2 штаммом M1 (ТИ4). Наибольшее повышение ЭМС наблюдали при одновременном возрастании N_2-фиксирующих активностей всех трех штаммов-мутуалистов (ТИ7). Исключение из колонизации клубеньковой субниши G1 любого штамма бактерий резко снижает его частоту в популяции. Важно отметить, что само по себе усиление обратной связи (задаваемой коэффициентами b_{ij}) приводит к повышению ЭМС (ТИ7), но не влияет на интегрированность системы. Однако усиление обратной связи дает максимальный адаптивный выигрыш в сочетании с ограниченной колонизацией клубеньков неактивными азотфиксаторами (ТИ2+ТИ3), то есть повышение азотфиксирующей активности наиболее полезно тогда, когда оно сопровождается совершенствованием структуры симбиоза.

Сопоставление 19 симбиосистем (вычисление парных коэффициентов корреляции между индексами, приведенными в таблице 2) показало, что величины ЭМС положительно коррелируют с частотами генотипа G1 в растительной популяции ($r = +0{,}934$; $P_0 < 0{,}01$), а также с частотами неспецифичного мутуалиста M3 в бактериальной популяции ($r = +0{,}533$; $P_0 < 0{,}05$), но отрицательно коррелируют с частотами неспособного к N_2-фиксации штамма P ($r = -0{,}582$; $P_0 < 0{,}01$), а также с индексами популяционного разнообразия растений и бактерий ($r = -0{,}961$ и $-0{,}809$; $P_0 < 0{,}01$).

При исходной схеме развития системы ее интегрированность была низкой (In_{PM}, $In_M < 0{,}25$), и при введении

* Поскольку суммы частот как бактериальных, так и растительных генотипов равны 1, то полные матрицы ковариаций будут вырожденными (определитель матрицы заведомо равен 0). Поэтому при составлении матриц мы исключали из них растительный генотип G2 и бактериальный генотип P, что позволило избежать вырожденности матриц, создавая возможность для дальнейших вычислений их собственных значений.

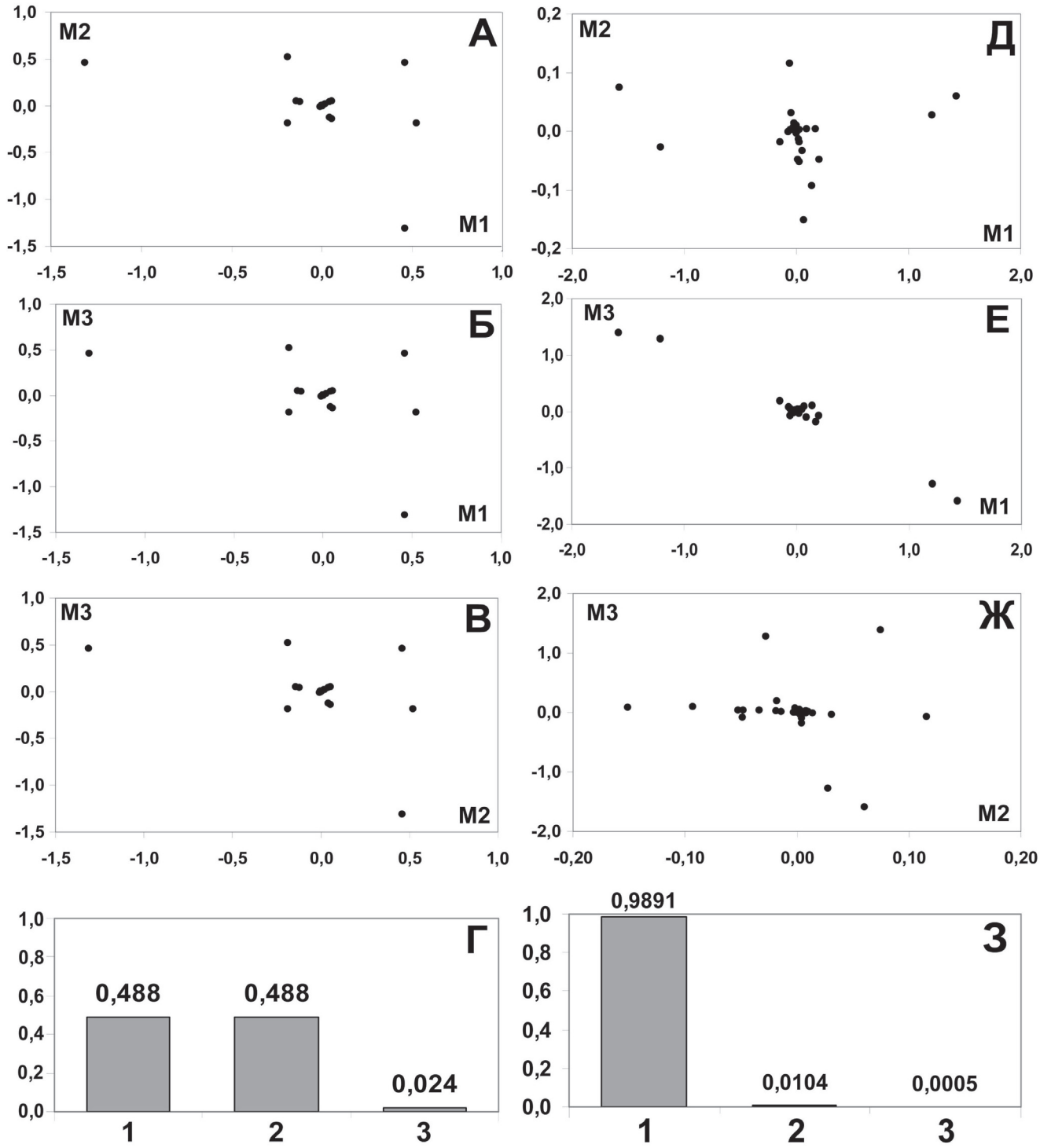

Рис. 1. Графическое представление данных о ковариации компонентов симбиосистемы и собственных значений матриц ковариации
А, Б, В — адаптивные реакции N_2-фиксирующих генотипов бактерий при изменении системных параметров модели (Приложение, табл. П6) в проекциях на плоскости: {М2, М1}, {М3, М1}, {М3, М2} для исходной схемы развития симбиоза с низким уровнем ФИС ($In_М$ = 0,216; см. табл. 2).
Д, Е, Ж — то же для схемы «ТИ1+ТИ2+ТИ4+ТИ6+ТИ7+ТИ8» с высоким уровнем ФИС ($In_М$ = 0,968).
Г, З — собственные значения матриц ковариаций для исходной схемы развития симбиоза и для схемы «ТИ1+ТИ2+ТИ4+ТИ6+ТИ7+ТИ8».
1, 2, 3 — номера ортогональных факторов в трехмерном пространстве адаптивных реакций М1, М2, М3.

Таблица 3

Связь функциональной интегрированности симбиоза (ФИС) с его адаптивно значимыми свойствами

Индексы ФИС (вычисляли по формуле 2)	Коэффициенты корреляции индексов ФИС с параметрами 19 симбиосистем*					
	ЭМС	Индексы разнообразия популяций		Финальные (при $t \to \infty$) частоты бактериальных генотипов**		
		растений	бактерий	P	M1+M2+M3	M3
In_{PM}	+0,728	−0,818	−0,978	−0,887	+0,887	+0,959
In_{M}	+0,708	−0,805	−0,973	−0,860	+0,860	+0,959

* Приведены значения коэффициентов корреляции, полученных при парных сравнениях показателей, представленных в таблице 2 (критическое значение коэффициента при $P_0 < 0,01$ составляет 0,575).
** Для частот M1 и M2 корреляции недостоверны (по абсолютной величине $r < 0,2$).

в эту схему единичных ТИ мы не выявили превышения индексов ФИС над величиной 0,5. Средние и высокие уровни ФИС характерны для тех систем, в которых колонизация клубеньковой ниши блокирована одновременно для двух штаммов ризобий (табл. 2). Максимальные индексы ФИС (In_{PM}, $In_{M} > 0,9$) выявлены для систем с множественными ТИ, которые по отдельности вызывают повышение ЭМС. При этом наибольшие величины ЭМС наблюдаются в случаях блокировки колонизации клубеньков G1 штаммами P и M2, которые обладают низкой азотфиксирующей активностью. Размножение их в клубеньках G1 приводит к ослаблению межкомпонентных связей в симбиосистеме, и как следствие, к снижению индекса ФИС (табл. 2). Это означает, что процессы инокуляции и колонизации клубеньковых ниш являются основополагающими в симбиосистеме: они влияют на межкомпонентные связи и направляют макроэволюционные процессы на повышение ЭМС.

При анализе связи между интегрированностью симбиоза и его адаптивно значимыми показателями выяснилось, что индексы ФИС, вычисленные как для всей симбиосистемы (In_{PM}), так и отдельно для бактериальной популяции (In_{M}) положительно коррелируют с ЭМС и с частотами M3, но отрицательно коррелирует с частотами генотипа P и с уровнями разнообразия партнеров (табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение целостности (интегрированности) организмов и надорганизменных систем — один из основных критериев их эволюционного прогресса (Северцов, 1967; Шмальгаузен, 1983; Яблоков, Юсуфов, 2004). Показатели морфо-физиологической интегрированности, основанные на анализе корреляционных матриц, были разработаны для растений (Ростова, Брач, 1989), человека (Горбань и др., 1987), а также для систем биоценотического типа (Hansen, Martins, 1996), однако для симбиозов подобных показателей предложено не было.

Созданные нами математические модели микроэволюции бобово-ризобиальной системы (Воробьев, Проворов, 2008; Проворов, Воробьев, 2009; Provorov, Vorobyov, 2008) позволяют изучать действие естественного отбора на повышение эффективности мутуалистического симбиоза (ЭМС), определяемой как его влияние на биологическую продуктивность партнеров. В настоящей статье представлена модифицированная модель, которая содержит набор системных параметров, позволяющих анализировать связь ЭМС с активностью N_2-фиксации и с доступностью клубеньковой ниши для колонизации штаммами бактерий, различающимися по этой активности. Для оценки уровня согласованности селективных ответов партнеров (изменений финальных генотипических частот) на внешние воздействия мы предложили индекс функциональной интегрированности симбиоза (ФИС), при вычислении которого используются собственные значения матриц ковариаций селективных ответов. Эти матрицы вычисляли по изменениям частот компонентов симбиосистемы в ответ на внешние воздействия, которые имитировали флуктуациями базовых значений системных параметров.

Для того, чтобы изучать связь функциональной интегрированности с адаптивно значимыми показателями симбиоза (ЭМС, уровни разнообразия растении и бактерий), мы внесли в схему его развития серию тест-изменений, отображающих возможные этапы макроэволюции симбиоза. Корреляционный анализ показал, что между ЭМС и индексами ФИС имеется высокая положительная корреляция, которая согласуется с характерным для эволюции бобово-ризобиального симбиоза координированным повышением его морфо-физиологической целостности и экологической эффективности (Provorov, Vorobyov, 2009). Таким образом, результаты компьютерных экспериментов позволяют предположить, что одной из причин возрастания генетической и структурно-функциональной интегрированности симбиоза является отбор на повышение ЭМС.

Компьютерные эксперименты показали, что эффективность симбиоза, которая зависит от интегральной азотфиксирующей активности внутриклубеньковой популяции ризобий, оказывается максимальной в сочетании с ограничениями на колонизацию клубеньковой ниши неактивными бактериальными штаммами, и таким образом, повышение азотфиксирующей активности бактерий создает благоприятный фон для закрепления макроэволюционных преобразований, обеспечивающих

повышение целостности симбиосистемы. В то же время, анализ корреляций ФИС и ЭМС показывает только общую эволюционную тенденцию, так как возможно повышение ЭМС без изменения ФИС (ТИ7), а также возрастание ФИС без резкого изменения ЭМС (ТИ2+ТИ4), то есть повышение интегрированности системы не обязательно носит адаптивный характер.

Важно отметить, что связь ФИС с индексами полиморфизма партнеров оказалась отрицательной, подтверждая выводы о том, что повышение популяционного разнообразия симбионтов сопряжено со снижением эффективности мутуализма и даже с его преобразованием в антагонизм (Frank, 1994; Douglas, 1998). Известно, что для фитопаразитарных систем повышение структурно-функциональной целостности партнеров происходит при переходах от некротрофии к биотрофии (Дьяков и др., 2001), которые можно рассматривать как результат эволюции патосистемы в направлении мутуализма (Lewis, 1974). Очевидно, что сравнительный анализ интегрированности различных типов симбиоза (мутуалистических, антагонистических) представляет большой интерес.

Предложенный нами подход для описания интегрированности симбиоза может быть использован при изучении свободноживущих (унитарных) организмов, для которых постулировано возрастание структурно-функциональной целостности в ходе адаптивной эволюции (Северцов, 1967; Шмальгаузен, 1983; Воробьева, 2006). Предложенная методика расчета ФИС может иметь прикладное значение, так как функциональная интегрированность относится к числу хозяйственно важных и селективно значимых показателей сельскохозяйственных культур (Lammerts van Bueren et al., 2003). Изменение структуры (усиление) корреляционных связей между адаптивно значимыми показателями липидного обмена выявлено при адаптации новорожденных детей к условиям Крайнего Севера (Горбань и др., 1987). При построении модели мы исходили из генетической общности биосистем организменного и симбиотического типов, основанной на образовании при симбиозе надорганизменной генетической системы (симбиогенома), обладающей рядом свойств генома свободноживущего (унитарного) организма (Тихонович, Проворов, 2009). Поэтому логично предположить, что адаптивные процессы в них происходят по близким схемам и характеризуются общей тенденцией повышения интегрированности в ходе микроэволюции.

Работа поддержана грантом РФФИ 09-04-00907а.

ПРИЛОЖЕНИЕ. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПОВ Т-ГО ЦИКЛА МИКРОЭВОЛЮЦИИ СИМБИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Бактериальные штаммы: Mi — мутанты (i = 1, 2, 3), P — родитель (i = 0).

На 2-м и 3-м этапах микроэволюционного цикла растительные генотипы G1 и G2 формируют 1-ю и 2-ю ризосферные субниши (РС), а также 1-ю и 2-ю клубеньковые субниши (КС).

Переменные, зависящие от номера цикла, выделены курсивом.

Таблица П1

Мутационный процесс в бактериальной популяции, находящейся почвенной нише, на 1-м этапе

Штаммы	Частоты в		Формулы для преобразования частот генотипов	Используемые величины и их соотношения
	начале этапа	конце этапа		
Mi	$\psi_{10Mi.t}$	$\psi_{20Mi.t}$	$\psi_{20Mi.t} = \psi_{10Mi.t} + q_i \times \psi_{10P.t}$	$0 < q_1, q_2, q_3 << 1$ — доли от числа клеток P, которые превращаются в M1, M2, M3 в результате мутаций
P	$\psi_{10P.t}$	$\psi_{20P.t}$	$\psi_{20P.t} = (1-q_1-q_2-q_3) \times \psi_{10P.t}$	

Таблица П2

Инокуляция бактериями симбиотических (ризосферных и клубеньковых) субниш на 2-м этапе

Субниши	Штаммы	Частоты в		Формулы для преобразования частот генотипов	Используемые величины и их соотношения
		начале этапа	конце этапа		
1-я , 2-я ризосферные	Mi	0	$\psi_{31Mi.t}$	$\psi_{31Mi.t} = \psi^{ri}_{20Mi.t} : F1$	ri — индексы инокуляции обеих РС для Mi, P; n1i — то же для 1-й КС; n2i — то же для 2-й КС. $F1 = \psi^{r1}_{20M1.t} + \psi^{r2}_{20M2.t} + \psi^{r3}_{20M3.t} + \psi^{r0}_{20P.t}$ — нормировочная величина, обеспечивающая выполнение условия: $\psi_{31M1.t} + \psi_{31M2.t} + \psi_{31M3.t} + \psi_{31P.t} = 1$; $F2 = \psi^{n11}_{31M1.t} + \psi^{n12}_{31M2.t} + \psi^{n13}_{31M3.t} + \psi^{n10}_{31P.t}$ — то же для $\psi_{32M1.t} + \psi_{32M2.t} + \psi_{32M3.t} + \psi_{32P.t} = 1$; $F3 = \psi^{n21}_{31M1.t} + \psi^{n22}_{31M2.t} + \psi^{n23}_{31M3.t} + \psi^{n20}_{31P.t}$ — то же для $\psi_{33M1.t} + \psi_{33M2.t} + \psi_{33M3.t} + \psi_{33P.t} = 1$;
	P	0	$\psi_{31P.t}$	$\psi_{31P.t} = \psi^{r0}_{20P.t} : F1$	
1-я клубеньковая	Mi	0	$\psi_{32Mi.t}$	$\psi_{32Mi.t} = \psi^{n1i}_{31Mi.t} : F2$	
	P	0	$\psi_{32P.t}$	$\psi_{32P.t} = \psi^{n10}_{31P.t} : F2$	
2-я клубеньковая	Mi	0	$\psi_{33Mi.t}$	$\psi_{33Mi.t} = \psi^{n2i}_{31Mi.t} : F3$	
	P	0	$\psi_{33P.t}$	$\psi_{33P.t} = \psi^{n20}_{31P.t} : F3$	

Таблица П3

Колонизация бактериями симбиотических (ризосферных и клубеньковых) субниш на 3-м этапе

Субниши	Генотипы	Частоты в начале этапа	Частоты в конце этапа	Формулы для преобразования частот генотипов	Используемые величины и их соотношения
1-я ризосферная	Mi	$\psi_{31Mi.t}$	$\psi_{41Mi.t}$	$\psi_{41Mi} = \psi_{31Mi.t} \times U1^{V1i} \times R_{11.t} / R_{31.t}$	$R_{11.t} = \alpha_t \times R_0$, $R_{12.t} = (1-\alpha_1) \times R_0$ — объемы инокуляции (ОИ) 1-й и 2-й РС (α_t — частота генотипа G1 в растительной популяции). $R_{31.t} = R_{21} \times \alpha_t$, $R_{32.t} = R_{22} \times (1-\alpha_t)$ — объемы колонизации (ОК) 1-й и 2-й РС. V1i, V2i — отношения скоростей размножения Mi:P в 1-й и 2-й РС. *U1, U2* — отношения частот P в конце и начале колонизации 1-й и 2-й РС, удовлетворяющие условиям: $\psi_{31M1.t} \times U1^{V11} + \psi_{31M2.t} \times U1^{V12} + \psi_{31M3.t} \times U1^{V13} + \psi_{31P.t} \times U1 = R_{31.t} / R_{11.t}$, $\psi_{31M1.t} \times U2^{V21} + \psi_{31M2.t} \times U2^{V22} + \psi_{31M3.t} \times U2^{V23} + \psi_{31P.t} \times U2 = R_{32.t} / R_{12.t}$. $N_{11.t} = \alpha_t \times N_0$, $N_{12.t} = (1-\alpha_t) \times N_0$ — ОИ 1-й и 2-й КС. $N_{31.t} = N_{21} \times \alpha_t$, $N_{32.t} = N_{22} \times (1-\alpha_t)$ — ОК 1-й и 2-й КС. V3i, V4i — отношения скоростей размножения Mi:P в 1-й и 2-й КС. *U3, U4* — отношения частот P в конце и начале колонизации 1-й и 2-й КС, удовлетворяющие условиям: $\psi_{32M1.t} \times U3^{V31 \times c1} + \psi_{32M2.t} \times U3^{V32 \times c2} + \psi_{32M3.t} \times U1^{V33 \times c3} + \psi_{32P.t} \times U3^{c0} = N_{31.t} / N_{11.t}$, $\psi_{31M1.t} \times U4^{V41} + \psi_{32M2.t} \times U4^{V42} + \psi_{33M3.t} \times U4^{V43} + \psi_{33P.t} \times U4 = N_{32.t} / N_{12.t}$, c0, ci — коэффициенты, определяющие доступность 1-й КС для колонизации бактериями P, Mi (если запрета на колонизацию нет, то коэффициент равен 1, если запрет есть, то коэффициент равен 0). Описание параметров R_{21}, R_{22}, N_{21}, N_{22} приводится в таблице П6.
	P	$\psi_{31P.t}$	$\psi_{41P.t}$	$\psi_{41P.t} = \psi_{31P.t} \times U1 \times R_{11.t} / R_{31.t}$	
2-я ризосферная	Mi	$\psi_{31Mi.t}$	$\psi_{42Mi.t}$	$\psi_{42Mi.t} = \psi_{31Mi.t} \times U2^{V2i} \times R_{12.t} / R_{32.t}$	
	P	$\psi_{31P.t}$	$\psi_{42P.t}$	$\psi_{42P.t} = \psi_{31P.t} \times U2 \times R_{12.t} / R_{32.t}$	
1-я клубеньковая	Mi	$\psi_{32Mi.t}$	$\psi_{43Mi.t}$	$\psi_{43Mi.t} = \psi_{32Mi.t} \times U3^{V3i \times ci} \times N_{11.t} / N_{31.t}$	
	P	$\psi_{32P.t}$	$\psi_{43P.t}$	$\psi_{43P.t} = \psi_{32P.t} \times U3^{c0} \times N_{11.t} / N_{31.t}$	
2-я клубеньковая	Mi	$\psi_{33Mi.t}$	$\psi_{44Mi.t}$	$\psi_{44Mi.t} = \psi_{33Mi.t} \times U4^{V4i} \times N_{12.t} / R_{32.t}$	
	P	$\psi_{33P.t}$	$\psi_{44P.t}$	$\psi_{44P.t} = \psi_{33P.t} \times U4 \times N_{12.t} / N_{32.t}$	

Таблица П4

Изменения структуры растительной популяции

Этапы	Генотипы	Частоты в* начале этапа	Частоты в* конце этапа	Формулы для преобразования частот генотипов	Используемые величины и их соотношения
2	G1	$\psi_{1G1.t}$	α_t	$a_t = \dfrac{\psi^{K1}_{1G1.t}}{\psi^{K1}_{1G1.t} + \psi^{K2}_{1G2.t}}$; $\psi_{2G2.t} = \dfrac{\psi^{K2}_{1G2.t}}{\psi^{K1}_{1G1.t} + \psi^{K2}_{1G2.t}}$	K1, K2 — индексы конкуренции генотипов G1, G2 при прорастании семян на 2-м этапе. $P_{11.t} = \alpha_t \times P_0$, $P_{12.t} = (1-\alpha_t) \times P_0$ — количества ювенильных растений генотипов G1, G2, сформировавшихся к концу 2-го этапа; $P_{31.t} = (P_{21} - P_0)(b_{11} \times \psi_{43M1.t} + b_{12} \times \psi_{43M2.t} + b_{13} \times \psi_{43M3.t}) \times \alpha_t + P_{11.t}$,
	G2	$\psi_{1G2.t}$	$\psi_{2G2.t}$		

Таблица П4 (окончание)

Изменения структуры растительной популяции

Этапы	Гено-типы	Частоты в*		Формулы для преобразования частот генотипов	Используемые величины и их соотношения
		начале этапа	конце этапа		
3	G1	α_t	$\psi_{3G1.t}$	$\psi_{3G1.t} = \frac{P_{31.t}}{P_{31.t} + P_{32.t}}$	$P_{32.t} = (P_{22} - P_0)(b_{21} \times \psi_{44M1.t} + b_{22} \times \psi_{44M2.t} + b_{23} \times \psi_{44M3.t}) \times (1 - \alpha_t) + P_{21.t}$ — количества семян, образованных генотипами G1, G2 к концу 3-го этапа. P_0 — минимальное количества семян, формируемых обоими генотипами при отсутствии азотфиксаторов в клубеньковых субнишах. b_{11}, b_{12}, b_{13}, b_{21}, b_{22}, b_{23}, P_{21} и P_{22} — описание параметров приводится в таблице П6
	G2	$\psi_{2G2.t}$	$\psi_{3G2.t}$	$\psi_{3G2.t} = \frac{P_{32.t}}{P_{31.t} + P_{32.t}}$	
*До начала 2-го этапа и после окончания 3-го этапа растительная популяция существует в форме покоящихся семян.					

Таблица П5

Выживание бактерий в почвенной нише на 4-м этапе

Штаммы	Частоты в		Формулы для преобразования частот генотипов	Используемые величины и их соотношения
	начале этапа	конце этапа		
Mi	$\psi_{50Mi.t}$	$\psi_{60Mi.t}$	$\psi_{50Mi.t} = (\psi_{20Mi.t} \times S + \psi_{41Mi.t} \times R_{31.t} + \psi_{42Mi.t} \times N_{31.t} + \psi_{44Mi.t} \times N_{32.t}) : L_t$ $\psi_{60Mi.t} = \psi_{50Mi.t} \times U5^{V5i} \times L_t / S$	$Lt = S + R_{31.t} + R_{32.t} + N_{31.t} + N_{32.t}$ — амплитуда популяционной волны. V5i — отношение скоростей отмирания Mi:P. *U5* — отношение частот P в конце и начале отмирания бактерий, удовлетворяющее условию: $\psi_{50M1.t} \times U5^{V51} + \psi_{50M2.t} \times U5^{V52} + \psi_{50M3.t} \times U5^{V53} + \psi_{50P.t} \times U5 = S/L_t$
P	$\psi_{50P.t}$	$\psi_{60P.t}$	$\psi_{50Mi.t} = (\psi_{20P.t} \times S + \psi_{41P.t} \times R_{32.t} + \psi_{43P.t} \times N_{31.t} + \psi_{44P.t} \times N_{32.t}) : L_t$ $\psi_{60P.t} = \psi_{50P.t} \times U5 \times L_t / S$	

Таблица П6

Системные параметры модели, использованные в компьютерных экспериментах

Определения*		Символы*	Базовые величины**	Размерности
Доли от числа клеток P, которые превращаются в Mi в результате мутаций	Mi	qi	10^{-10}	Безразмерные
Индексы инокуляции обеих ризосферных субниш (РС) родительским (P) и мутантными (Mi) штаммами	P	r0	0,4	Безразмерные
	Mi	ri	0,6	
Индексы инокуляции 1-й и 2-й клубеньковых субниш (КС) родительским (P) и мутантными (Mi) штаммами	P	n10 и n20	0,4 и 0,4	Безразмерные
	Mi	n1i и n2i	0,6 и 0,6	
Относительные скорости размножения мутантов (Mi : P) в 1-й и 2-й РС	Mi	V1i и V2i	1,1 и 1,1	Безразмерные
Относительные скорости размножения мутантов (Mi : P) в 1-й и 2-й КС	Mi	V3i и V4i	1,1 и 1,1	Безразмерные
Коэффициенты азотфиксирующей активности мутантов Mi в 1-й и 2-й КС***	M1	b11 и b21	0,50 и 0,17	Безразмерные
	M2	b12 и b22	0,17 и 0,50	
	M3	b13 и b23	0,33 и 0,33	
Относительные скорости отмирания мутантов (Mi : P) в почве	Mi	V5i	1,01	Безразмерные
Индексы конкуренции семян растительных генотипов G1 и G2 при прорастании	Gk	Kk	0,6	Безразмерные
Минимальное суммарное число семян G1 и G2 в конце микроэволюционного цикла		P_0	10^9	Число семян
Максимальное число семян G1 и G2 (при 100% частоте Fix+ бактерий в КС)		P_{2k}	30×10^9	

Таблица П6 (окончание)

Изменения структуры растительной популяции

Определения*	Символы*	Базовые величины**	Размерности
Минимальный суммарный объем колонизации (ОК) бактериями обеих РС	R_0	10^{12}	Число клеток
Максимальные ОК k-й РС	R_{2k}	10×10^{12}	Число клеток
Минимальный суммарный ОК бактериями обеих КС	N_0	10^{14}	Число клеток
Максимальные ОК k-й КС	N_{2k}	40×10^{14}	Число клеток
Объем почвенной ниши	S	10^{12}	Число клеток

* Бактериальные генотипы (P, M1, M2, M3) имеют индексы i = 0, 1, 2, 3, растительные генотипы (G1, G2) — индексы k = 1, 2.
** Базовые значения параметров являются средними значениями промежутков, в которых исследуются результаты параметрического варьирования математической модели. Промежутки выбраны, исходя из литературных и собственных экспериментальных данных, и являются оценочными усредненными характеристиками симбиосистем, рассмотренными ранее (Проворов, Воробьев, 1998а, 1998б; Provorov, Vorobyov, 2008).
*** Данные коэффициенты отражают величину обратной связи, трактуемой как поток азота в растение, создаваемый одной клеткой соответствующего штамма (чем больше этот поток, тем выше интенсивность фотосинтеза и тем больше его продуктов растение передает в клубеньковые и ризосферные ниши). Использованное математическое выражение обратной связи может быть применено для описания разных типов трофических симбиозов, связанных с передачей растению и других питательных элементов, например, фосфатов в случае арбускулярной микоризы.

Литература

1. *Воробьев Н. И., Проворов Н. А.,* 2008. Моделирование эволюции бобово-ризобиального симбиоза при мультиштаммовой конкуренции бактерий за инокуляцию симбиотических ниш // Экологич. генетика. Т. 6. № 4. С. 3–11.
2. *Воробьева Э. И.,* 2006. Проблема целостности организма и ее перспективы // Изв. РАН, серия биологич. № 5. С. 530–540.
3. *Горбань А. Н, Манчук В. Т., Петушкова Е. В.,* 1987. Динамика корреляций между физиологическими параметрами при адаптации и эколого-эволюционный принцип полифакториальности // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. Л.: Гидрометеоиздат. Т. 10. С. 187–198.
4. *Дьяков Ю. Т., Озерецковская О. Л., Джавахия В. Г., Багирова С. Ф.,* 2001. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Изд-во Общество фитопатологов. 302 с.
5. *Кулаичев А. П.,* 2006. Методы и средства комплексного анализа данных. М.: ФОРУМ – ИНФРА-М. 512 с.
6. *Проворов Н. А.,* 2001. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журн. общ. биологии. Т. 62. № 6. С. 472–495.
7. *Проворов Н. А., Борисов А. Ю., Тихонович И. А.,* 2002. Сравнительная генетика и эволюционная морфология симбиозов растений с микробами-азотфиксаторами и эндомикоризными грибами // Журн. общ. биологии. Т. 63. № 6. С. 451–472.
8. *Проворов Н. А., Воробьев Н. И.,* 2009. Моделирование ко-эволюции бактерий и растений в системе мутуалистического симбиоза // Генетика. Т. 45. № 5. С. 581–594.
9. *Ростова Н. С., Брач Н. Б.,* 1989. Генотипические и экологические корреляции некоторых признаков льна-долгунца // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. Т. 125. С. 56–64.
10. *Северцов А. Н.,* 1967. Главные направления эволюционного процесса. М.: Изд-во МГУ. 201 с.
11. *Тихонович И. А., Проворов Н. А.,* 2003. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий // Экологич. генетика. Т. 1. № 0. С. 36–46.
12. *Тихонович И. А., Проворов Н. А.,* 2009. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. СПб: Изд-во СПбГУ. 210 с.
13. *Шмальгаузен И. И.,* 1983. Пути и закономерности эволюционного процесса. М.: Наука. 404 с.
14. *Яблоков А. В., Юсуфов А. Г.,* 2004. Эволюционное учение. М.: Высш. школа. 310 с.
15. *Douglas A. E.,* 1998. Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis // Heredity. Vol. 81. N 6. P. 599–603.
16. *Frank S. A.,* 1994. Genetics of mutualism: the evolution of altruism between species // J. Theor. Biol. Vol. 170. P. 393–400.
17. *Hansen T. F., Martins E. P.,* 1996. Translating between microevolutionary processes and macroevolutionary patterns: the correlation structure of inter-specific data // Evolution. Vol. 50. P. 1404–1417.
18. *Lammerts van Bueren E. T., Struik P. C., Tiemens-Hulscher M., Jacobsen E.,* 2003. Concepts of intrinsic value and integrity of plants on organic plant breeding and propagation // Crop. Sci. Vol. 43. P. 1922–1929.
19. *Lewis D. H.,* 1974. Microorganisms and plants: the evolution of parasitism and mutualism // Evolution of Microbial World. Cambridge: Univ. Press. P. 367–392.

20. *Nei M.,* 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. Vol. 89. P. 583–590.
21. *Provorov N. A., Saimnazarov U. B., Bahromov I. U., Pulatova D. Z., Kozhemyakov A. P., Kurbanov G. A.,* 1998. Effect of rhizobia inoculation on the seed (herbage) production of mungbean (Phaseolus aureus Roxb.) grown at Uzbekistan. J. Arid Environ. Vol. 39. P. 569–575.
22. *Provorov N. A., Vorobyov N. I.,* 2008. Equilibrium between the "genuine mutualists" and "symbiotic cheaters" in the bacterial population co-evolving with plants in a facultative symbiosis // Theor. Population Biol. Vol. 74. N 4. P. 345–355.
23. *Provorov N. A., Vorobyov N. I.,* 2009. Host plant as on organizer of microbial evolution in the beneficial symbioses // Phytochemical Reviews. Vol. 8. P. 519–534.
24. *Sprent J. I.,* 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the ocurrence of nodulation // New Phytologist. Vol. 174. P. 11–25.
25. *Tikhonovich I. A., Provorov N. A.,* 2009. From plant-microbe interactions to symbiogenetics: a universal paradigm for the inter-species genetic integration // Ann. Appl. Biol. Vol. 154. N 3. P. 341–350.

SIMULATION OF EVOLUTION OF THE LEGUME-RHIZOBIA SYMBIOSIS FOR AN IMPROVED FUNCTIONAL INTEGRITY OF PARTNERS AND FOR ECOLOGICAL EFFICIENCY OF THEIR INTERACTION

Vorobyov N. I., Provorov N. A.

❀ **SUMMARY: Simulation of evolution in the legume-rhizobial symbiosis allowed us to suggest the mathematical criterion (index) for the functional integrity of symbiosis (FIS). Calculation of FIS index is based on analysis of the covariance matrix of partners' frequencies influenced by fluctuations of the systemic parameters. The positive correlations of FIS with ecological efficiency of symbiosis (its impact on the seed productivity of plants) and a negative correlation with the partners' diversity indices were demonstrated. The revealed dependences allow us to explain the increasing of structural-functional integrity in mutualistic symbiosis by operation of the natural selection in favor of an improved ecological efficiency of partners' interactions.**

❀ **KEY WORDS:** mutualistic symbiosis; nodule bacteria; mathematical simulation; co-variation matrices; correlation analysis; integrity of biosystems; population polymorphism; natural selection; evolution of symbiosis.

❀ Информация об авторах

Воробьев Николай Иванович — к. техн. н., руководитель группы биоинформатики и математического моделирования. Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Шоссе Подбельского, д. 3, Санкт-Петербург, Пушкин-8, 196608. E-mail: vorobyov@arriam.spb.ru.

Проворов Николай Александрович — д. б. н., заместитель директора. Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Шоссе Подбельского, д. 3, Санкт-Петербург, Пушкин-8, 196608. E-mail: provorov@newmail.ru.

Vorobyov Nikolay Ivanovich — Candidate of Technical Sciences, Head of the Group of Bioinformatics and Mathematical Simulation. Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelsky Chaussee 3, St. Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: vorobyov@arriam.spb.ru.

Provorov Nikolay Alexandrovich — Doctor of Biological Sciences, Deputy Director. Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelsky Chaussee 3, St. Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: provorov@newmail.ru.

УДК [574 : 539.163 + 615.916.1 : 546.16] + 591.1 + 575.1

© В. И. Стариченко

Институт экологии растений
и животных УрО РАН,
Екатеринбург

МЕТАБОЛИЗМ ОСТЕОТРОПНЫХ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ: НАСЛЕДСТВЕННАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ

❀ У лабораторных линейных мышей оценена наследственная компонента изменчивости (внутрисемейная корреляция) метаболизма остеотропных токсических веществ — ^{90}Sr (однократное введение) и стабильного фтора (хроническое поступление) в сравнении с корреляцией морфологических признаков, наследственная обусловленность развития которых известна. Оценку проводили при контроле эффектов половой, возрастной и линейной принадлежности животных, а также условий их развития и величины помета. Выявлена значимая внутрисемейная корреляция ($r = 0,4-0,5$; $p < 0,0001$) концентрации ^{90}Sr и фтора в костной ткани, сопоставимая с корреляцией морфологических признаков, что свидетельствует о наследственной детерминации метаболизма остеотропных токсических веществ.

❀ **Ключевые слова**: остеотропные вещества (^{90}Sr, фтор); костная ткань; линейные мыши; семейный анализ; дисперсионный анализ; коэффициент внутриклассовой корреляции.

Поступила в редакцию 25.01.2010.
Принята к публикации 01.06.2010.

ВВЕДЕНИЕ

Остеотропные химические элементы, в том числе радионуклиды, занимают важнейшее место в ряду техногенных поллютантов. Их характерной особенностью является избирательная кумуляция в костной ткани позвоночных животных и человека, где накапливается до 90 % поступившего в кровоток вещества. Многие из них токсичны. Например, техногенные фтор и свинец вызывают флюороз и свинцовую интоксикацию, бериллий приводит к «бериллиевому рахиту», радионуклиды являются источниками внутреннего облучения, которое вызывает хроническую лучевую болезнь, канцерогенез и уменьшение продолжительности жизни.

Поведение остеотропных веществ в организме позвоночных к настоящему времени изучено достаточно подробно (обзоры: Метаболизм стронция, 1971; Баженов и др., 1990; Журавлев, 1990; Стариченко и др., 1993; Шведов, Аклеев, 2001). Показано существование значительных различий их кинетики у индивидов одного возраста и пола (см. обзор Стариченко, 2009), однако вклад эндо- и экзогенных факторов в индивидуальные особенности их метаболизма не оценен, вследствие чего проблема индивидуального прогнозирования обмена остеотропных веществ остается нерешенной. Использование же средних величин для отдельного индивида может привести к существенной ошибке в оценке кинетики радионуклида (Likhtarev et al., 1975; Thomas et al., 1984) и, соответственно, дозы внутреннего облучения. Прогнозирование индивидуальной толерантности к остеотропным токсикантам особенно актуально в условиях техногенных аварий, когда в организм больших групп населения и сельскохозяйственных животных из внешней среды поступают остеотропные токсические вещества.

Морфогенез скелета — генетически контролируемый, высоко устойчивый процесс (Васильев и др., 1986; Васильева и др., 1988). Особенности обмена (метаболизма, кинетики) остеотропных веществ также определяются генотипом индивида, однако прямые доказательства тому отсутствуют. В то же время индивидуальные характеристики депонирования остеотропных радионуклидов достаточно устойчивы, их трудно изменить даже экстремальными экзогенными воздействиями, грозящими дальнейшему существованию индивида (Степина и др., 1973; Стариченко и др., 1993), и это косвенно свидетельствует о наследуемости обмена излучателей в организме.

Генотипическая детерминация обмена стабильного кальция активно изучается в связи с остротой ряда медицинских проблем, в первую очередь, проблемы остеопороза (Беневоленская, Финогенова, 1999; Оганов, 2003; Slemenda et al,, 1996; Ralston, Crombrugghe, 2006; и др.). Однако наследственная обусловленность метаболизма других стабильных и радиоактивных остеотропных веществ, в частности ^{90}Sr, одного из основных дозообразую-

щих радионуклидов на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРСа), не нашла экспериментального подтверждения при использовании метода межлинейных сравнений (Шведов, 1965; Стариченко, Григоркина, 1991; Шведов, Аклеев, 2001). Между тем имеются наблюдения (Шагина и др., 2006), что у людей, проживающих на территории ВУРСа в условиях хронического поступления ^{90}Sr, дисперсия его содержания внутри отдельных семей ниже, чем в среднем по населенному пункту. В то же время известно, что межлинейные сравнения, хорошо зарекомендовавшие себя в отношении качественных признаков, для количественных характеристик часто дают неудовлетворительные результаты (Фогель, Мотульски, 1990). Классическим подходом к оценке наследственной компоненты изменчивости количественных признаков является семейный анализ.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка наследственной компоненты изменчивости метаболизма остеотропных токсических веществ (на примере ^{90}Sr и стабильного фтора) у линейных мышей, в том числе, на фоне влияния различных эндогенных и средовых факторов, модифицирующих ростовые процессы в организме.

Обоснование наследственной детерминированности метаболизма остеотропных веществ будет служить основанием рекомендовать проведение профотбора по пригодности к работам, связанным с поступлением токсических веществ или проводимым в условиях патологических нагрузок на костно-суставную систему.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы лабораторные мыши линий CBA, BALB/c и BC (потомство гибридов второго поколения от скрещивания животных линий BALB/c – самка и CBA – самец, размножавшихся в течение 10 лет путем близкородственного скрещивания и достигших состояния полного инбридинга), разводимые в виварии Института экологии растений и животных УрО РАН. На мышах этих линий (с учетом семейной принадлежности животных) изучали кинетику в костной ткани ^{90}Sr (однократное введение) и стабильного фтора (хроническое поступление). Стабильный фтор пригоден для длительной затравки большого количества животных; подобный эксперимент со ^{90}Sr методически осуществить сложно.

Эксперимент со ^{90}Sr

^{90}Sr вводили мышам линии CBA внутрибрюшинно в позднем онтогенезе (за 3 нед до умерщвления). Применяли индикаторное количество радионуклида, которое в 200–300 раз меньше количества, вызывающего острые токсические эффекты, а дозы облучения, создаваемые которым, не приводят к нарушению процессов жизнедеятельности организма (Баженов и др., 1990; Журавлев, 1990; Ильин и др., 1991). При этом животные различались возрастом (на момент эвтаназии возраст 1–2,5 мес; возраст 2–3,5 мес) и физиологическим состоянием (животные контрольной группы с рождения находились в условиях нормального, опытной — замедленного развития скелета). Контрольных животных содержали на стандартном виварном рационе. В опытной группе в качестве модификатора ростовых процессов использована несбалансированная материнская диета (овсяная монофагия), применение которой с момента рождения у линейных мышей приводит к резкому уменьшению массовых и метрических характеристик потомства (Стариченко и др., 1993). В течение подсосного периода воздействие монофагии было опосредованным — через материнскую диету. По мере взросления животные переходили на самостоятельное питание, и находились на диете до окончания эксперимента.

ЭКСПЕРИМЕНТ С ФТОРОМ

Кинетику фтора изучали у мышей линий CBA, BALB/c и BC. В контрольной группе исследовали фоновые уровни фтора (виварный рацион), в опытной группе — после поступления токсиканта с пищей (раствор фторида натрия с концентрацией 0,5 г/л; из расчета 1 мл — на мышь) в течение всей беременности самок и до конца эксперимента (возраст животных на момент эвтаназии 1,5 мес).

С момента родов в обоих экспериментах содержание животных — посемейное (самка и ее потомство). Через месяц после родов самок отсаживали. Во избежание дефицита кальция и витаминов в рацион всех животных включали минеральную подкормку кусковым мелом и свежую зелень (в том числе при содержании животных на измененной диете). Болезненные процедуры и умерщвление осуществляли путем передозировки эфирного наркоза (Правила проведения..., 1977). После эвтаназии животных исследовали массу их тела и массу бедренных костей; определение концентрации токсиканта (^{90}Sr — Бк/г; фтор — мкг/г) проводили по лабораторным методикам: ^{90}Sr — методом радиометрии с использованием калийных эталонов, фтор — потенциометрическим методом с использованием фторселективного электрода (Стариченко, 2000; Стариченко, Кшнясев, 2004). В эксперименте со ^{90}Sr исследовано потомство из 80 семей (количество животных n = 434), в эксперименте с фтором — из 79 семей (n = 582). Количество детенышей в семьях при рождении варьировало от 2 до 20, но в силу материнского каннибализма в трех семьях к концу эксперимента осталось по одному детенышу.

Концентрация ^{90}Sr, а также масса тела и масса костей животных в обоих экспериментах имеют распределение, близкое к нормальному, концентрация фтора —логнормальное распределение. Поэтому для

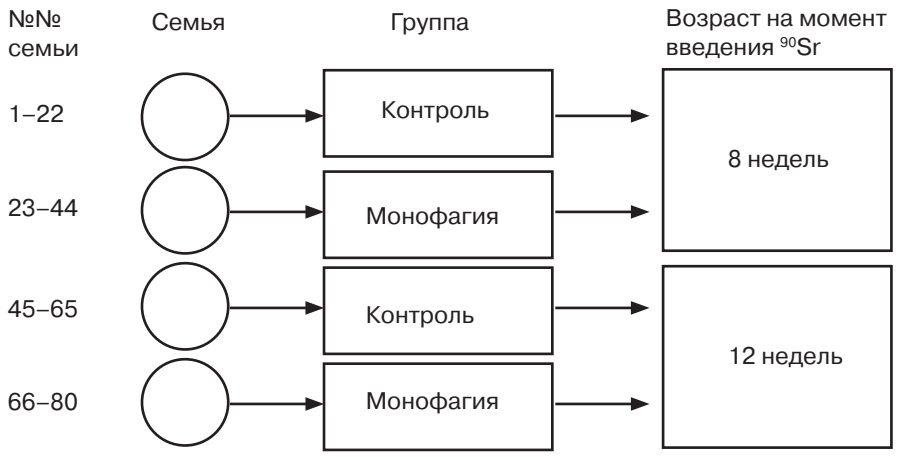

Рис. 1. Схема распределения семей между экспериментальными группами разновозрастных мышей линии CBA при изучении кинетики ^{90}Sr

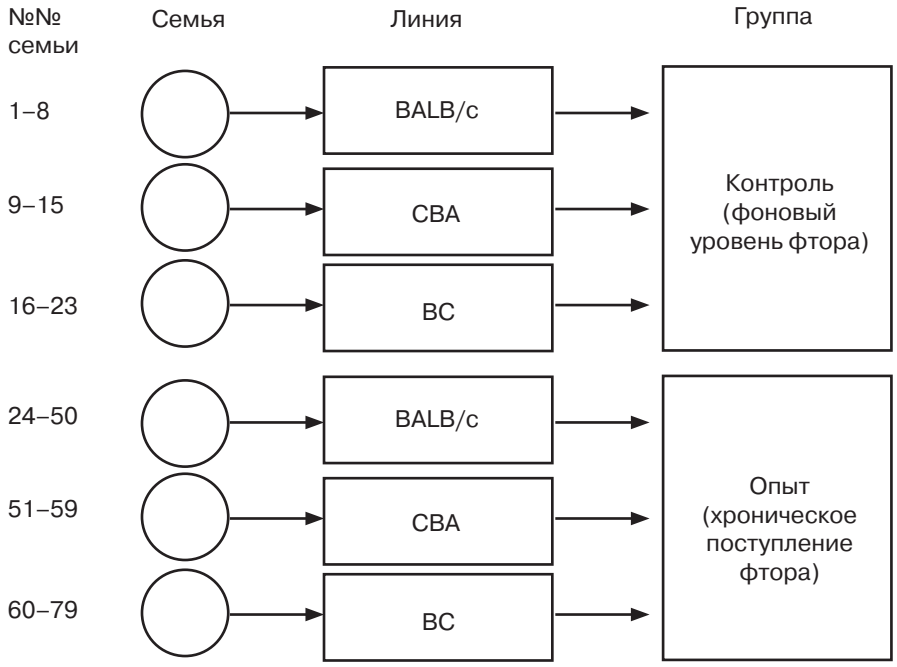

Рис. 2. Схема распределения семей между экспериментальными группами одновозрастных линейных мышей при изучении кинетики стабильного фтора

соблюдения предположения нормальности использовали логарифмическое преобразование концентрации фтора, однако для простоты изложения мы употребляем словосочетание «концентрация фтора», подразумевая под ним как собственно концентрацию, так и логарифм концентрации.

Для статистического вывода (на 5 % уровне значимости) использована компонентная модель иерархического дисперсионного анализа — план со смешанными эффектами, в которой факторы «группа», «пол», «возраст» (эксперимент со ^{90}Sr), «линия» (эксперимент с фтором) и ковариата «величина помета» рассмотрены как фиксированные, а фактор «семья» — как случайный. Ковариата (сопутствующая независимая переменная) «величина помета» включена в анализ, так как известно, что у многоплодных млекопитающих число детенышей в помете является одним из источников изменчивости массовых показателей потомства.

В эксперименте со ^{90}Sr уровни фактора «семья» сгруппированы внутри уровней фактора «группа» (рис. 1), в эксперименте с фтором — внутри фактора «линия» (рис. 2). Оценкой наследственной компоненты изменчивости исследуемых признаков служил коэффициент внутриклассовой корреляции (R), соответствующий отношению компоненты дисперсии случайного фактора «семья» к полной

Таблица 1

Концентрация ^{90}Sr в костной ткани мышей линии CBA и массовые характеристики экспериментальных животных (M ± m)

Возраст на момент эвтаназии	Группа	Пол	n	Масса, г		^{90}Sr, Бк/г
				Тело	Бедренная кость[1)]	
1 (2,5 мес)	Контроль-1	Самцы	94	18,8 ± 0,1*	0,1031 ± 0,001*	891 ± 22*
		Самки	72	16,0 ± 0,1	0,0969 ± 0,001	992 ± 26
		Самцы и самки	166 (22)[2)]	17,6 ± 0,2	0,1004 ± 0,001	935 ± 17
	Опыт-1	Самцы	62	11,8 ± 0,3	0,0733 ± 0,001	1638 ± 35
		Самки	71	11,6 ± 0,2	0,0722 ± 0,001	1579 ± 32
		Самцы и самки	133 (22)	11,7 ± 0,2	0,0727 ± 0,001	1606 ± 24
2 (3,5 мес)	Контроль-2	Самцы	51	22,8 ± 0,3*	0,1206 ± 0,001	606 ± 9*
		Самки	31	19,8 ± 0,2	0,1178 ± 0,001	704 ± 15
		Самцы и самки	82 (21)	21,7 ± 0,3	0,1196 ± 0,001	643 ± 10
	Опыт-2	Самцы	19	15,0 ± 0,4*	0,0894 ± 0,002	1169 ± 69
		Самки	34	13,0 ± 0,4	0,0837 ± 0,002	1320 ± 57
		Самцы и самки	53(15)	13,7 ± 0,3	0,0858 ± 0,002	1266 ± 45

Примечание:
1) — обе кости.
2) — число семей в группе.
* — различия между самцами и самками в группе значимы на уровне $p \leq 0,05$ (по t-критерию Стьюдента).

дисперсии (Sokal, Rohlf, 1995) (компонента дисперсии равна R × 100 %). Для описания данных использовали среднее значение и стандартную ошибку среднего или медиану и квартили. Значимость различий между выборками оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, F-критерия и критерия Ньюмена–Кеулса. Анализ данных выполнен с помощью компьютерного пакета лицензионной программы Statistica 6,0 (StatSoft Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Массовые характеристики и результаты радиометрического анализа костной ткани экспериментальных животных представлены в табл. 1. Как следует из приведенных данных, на протяжении всего эксперимента животные (суммарно самцы и самки), содержавшиеся на овсяной диете, были гораздо мельче контрольных (без выраженных диспропорций в размерах тела). В группах «монофагия» наблюдается значимое, по сравнению с контролем, уменьшение массы тела и массы бедренных костей: возраст 2,5 мес — F (1;295) = 868,4 и F (1;295) = 729,5 соответственно; возраст 3,5 мес — F (1;131) = 380,6 и F (1;131) = 380,6 соответственно. При сравнении разновозрастных контрольных групп друг с другом также наблюдаются значимые различия: масса тела — F (1;244) = 344,2; масса бедренных костей — F (1;244) = 337,6; при сравнении опытных групп друг с другом — F (1;182) = 43,2 и F (1;182) = 65,4 соответственно. Различались также поведенческие и физиологические реакции животных. Например, у контрольных животных уже в возрасте 2,5 мес наблюдали случаи спаривания и последующей беременности самок (родивших и беременных самок выбраковывали из эксперимента) и отсутствие такового у животных, содержавшихся на овсяной монофагии, как первой, так и второй возрастной групп. Кроме того, в некоторых семьях опытных групп после отсадки самок в месячном возрасте потомства часть детенышей погибали от истощения, так как не были готовы к переходу на самостоятельное питание. Приведенные факты свидетельствуют не только о нарушении ростовых процессов, но и о гормональных сдвигах в организме опытных животных.

Как в контроле, так и в опыте наблюдается значимое снижение уровня депонирования ^{90}Sr с возрастом. Например, в «контроле-1» (суммарно для самцов и самок) концентрация ^{90}Sr составляет 935±17 Бк/г, в «контроле-2» (суммарно для самцов и самок) — 643±10 Бк/г, в опытных группах — 1606±24 и 1266±45 Бк/г соответственно. При этом аккумуляция ^{90}Sr у животных опытных групп значимо выше.

В таблице 2 представлены результаты эксперимента с фтором. В опытной группе (самцы и самки трех линий) наблюдается значимое, по сравнению с контрольной, уменьшение массы тела животных (F (1;569) = 78,7) и массы бедренной кости (F (1;569) = 36,7). Концентрация фтора в костной ткани у отдельных особей в контроле варьирует от 90 до 268 мкг/г и соответствует фоновому уровню содержания этого элемента в костной

Таблица 2

Концентрация фтора в костной ткани мышей линий CBA, BALB/c и BC и массовые характеристики экспериментальных животных (M ± m)

Группа	Пол	n	Масса, г		F, мкг/г
			Тело	Бедренная кость	
Контроль	**CBA**				
	Самцы	17	17,6 ± 0,7	0,0573 ± 0,0027	161 ± 7
	Самки	21	16,5 ± 0,6	0,0582 ± 0,0024	148 ± 6
	Самцы и самки	38 (7) [1]	17,0 ± 0,4	0,0578 ± 0,0018	154 ± 5
	BALB/c				
	Самцы	17	21,0 ± 0,5	0,0729 ± 0,0023	161 ± 6
	Самки	24	19,8 ± 0,3	0,0681 ± 0,0013	153 ± 7
	Самцы и самки	41 (8)	20,3 ± 0,3	0,0701 ± 0,0013	156 ± 5
	BC				
	Самцы	47	17,7 ± 0,4*	0,0587 ± 0,0018	168 ± 5
	Самки	40	16,5 ± 0,3	0,0571 ± 0,0017	159 ± 5
	Самцы и самки	87 (8)	17,1 ± 0,3	0,0580 ± 0,0011	164 ± 4
Среднее по группе		166 (23)	17,9 ± 0,2	0,0609 ± 0,0009	160 ± 2
Опыт[2]	**CBA**				
	Самцы	26	17,4 ± 0,2*	0,0594 ± 0,0010*	2957 ± 144
	Самки	33	15,2 ± 0,2	0,0517 ± 0,0009	3141 ± 123
	Самцы и самки	59 (9)	16,2 ± 0,2	0,0551 ± 0,0008	3060 ± 94
	BALB/c				
	Самцы	81	17,9 ± 0,3*	0,0574 ± 0,0010	2773 ± 97
	Самки	77	16,8 ± 0,3	0,0563 ± 0,0010	2603 ± 106
	Самцы и самки	158 (27)	17,4 ± 0,2	0,0569 ± 0,0007	2690 ± 72
	BC				
	Самцы	92	16,2 ± 0,3*	0,0598 ± 0,0010	2697 ± 92
	Самки	107	15,3 ± 0,2	0,0588 ± 0,0009	2592 ± 100
	Самцы и самки	199 (20)	15,7 ± 0,2	0,0593 ± 0,0007	2640 ± 68
Среднее по группе		416 (56)	16,4 ± 0,1	0,0578 ± 0,0004	2719 ± 45

Примечание:
[1] — число семей в группе.
[2] — поступление фтора в пре- и постнатальный период.
* — различия между самцами и самками в группе внутри отдельных линий значимы на уровне $p \leq 0,05$ (по t-критерию Стьюдента).

ткани млекопитающих и человека — 50–450 мкг/г (Габович, 1957; Книжников, 1975; Любашевский и др., 1996). В опытной группе аккумуляция фтора на порядок выше — 980–6430 мкг/г.

При сравнении линий друг с другом внутри контрольной и опытной групп оказалось, что различия в концентрации фтора между ними незначимы (по критерию Ньюмена–Кеулса), за исключением линии CBA в опыте.

Влияние пола животных на массовые показатели и концентрацию ^{90}Sr и фтора выявлено не во всех экспериментальных группах (табл. 1, 2). Половой диморфизм характеристик массы у большинства видов позвоночных хорошо известен. На метаболические показатели половая принадлежность животных влияет в меньшей степени. Например, для ^{90}Sr половые различия значимы в обеих контрольных, но отсутствуют в опытных группах; для фтора влияние этого фактора (на уровне отдельных линий внутри групп) не обнаружено.

Вместе с тем индивидуальные показатели депонирования ^{90}Sr и фтора различаются в отдельных экспериментальных группах в 2–8 раз (коэффициент вариации концентрации ^{90}Sr составляет 13,5–25,9 %, концентрации фтора — 23,5–36,5 %, массовых показателей — 5,8–18,2 %). Несмотря на меньшую величину аккумуляции

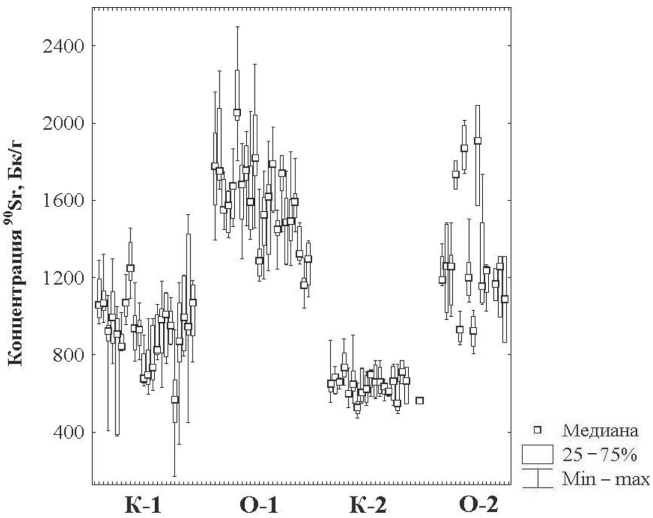

Рис. 3. Концентрация ^{90}Sr в костной ткани мышей CBA в отдельных семьях экспериментальных групп (К — контроль, О — опыт, 1-го и 2-го возрастов соответственно)

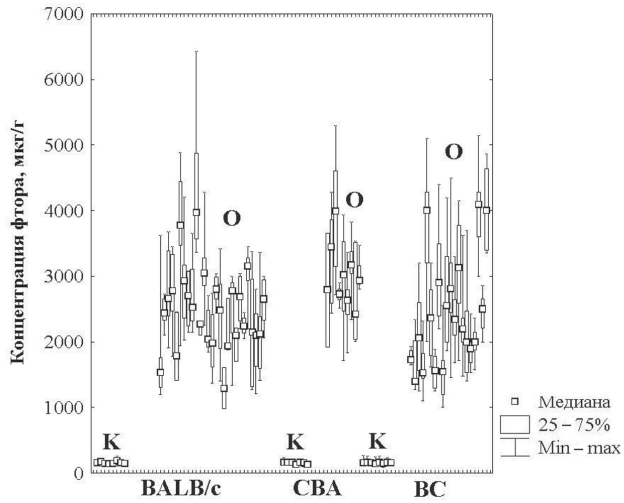

Рис. 4. Концентрация фтора в костной ткани линейных мышей в отдельных семьях экспериментальных групп (К — контроль, О — опыт).

^{90}Sr в контрольных группах по сравнению с опытными, максимальные индивидуальные показатели депонирования в контрольных группах попадают в разброс индивидуальных показателей в опытных группах, то есть размах индивидуальных показателей перекрывает межгрупповые (Стариченко, 2005). Для фтора подобная картина наблюдается для отдельных линий внутри экспериментальных групп. При этом характерно, что особенности накопления ^{90}Sr и фтора затрагивают целые семьи. Размах индивидуальных параметров депонирования внутри отдельных семей представлен на рисунках 3, 4.

Результаты дисперсионного анализа представлены в таблицах 3 и 4. Концентрации ^{90}Sr и фтора приведены в сравнении с данными по массе тела и массе бедренной кости.

Эффекты факторов «пол», «возраст», «линия» и «группа» на все рассматриваемые показатели обсуждены выше и совпадают с данными таблицы 1, 2. Влияние ковариаты «величина помета» в обоих случаях выявлено только для массы тела и массы бедренной кости.

Компонента дисперсии, обусловленная фактором «семья», значима ($p < 0{,}0001$) в обоих экспериментах для всех исследованных показателей. Внутрисемейная корреляция составляет для массы тела 0,391 в эксперименте со ^{90}Sr и 0,455 — в эксперименте с фтором, для массы бедренных костей — 0,443 и 0,478, для концентрации веществ — 0,513 и 0,417 соответственно. При этом внутрисемейная корреляция обменных показателей (концентрации вещества) близка к корреляции массовых характеристик.

ОБСУЖДЕНИЕ

Генотипическая детерминированность чувствительности к действию остеотропных токсикантов, внешнему и внутреннему (в частности, от инкорпорированного в скелете ^{90}Sr) облучению показана во многих работах (Поспишил, Ваха, 1986; Любашевский и др., 1996; Шведов, Аклеев, 2001; Roderick, 1963; Storer, 1966; и др.). В отношении кинетики остеотропных веществ роль наследственной компоненты выявлена только для морфофизиологических факторов, ответственных за судьбу токсиканта в организме позвоночных (Стариченко и др., 1993). И, хотя в настоящее время не подлежит сомнению, что все признаки и свойства организма детерминированы генетически, для остеотропных токсических веществ прямые доказательства наследственной обусловленности их метаболизма отсутствуют. Более того, не обнаружив наследственную компоненту с помощью метода межлинейных сравнений, в частности для ^{90}Sr, авторы (Шведов, 1965; Шведов, Аклеев, 2001), в сущности, отрицают его наследственную детерминацию. Мы также показали незначительные межлинейные различия в накоплении фтора и отсутствие различий в депонировании ^{90}Sr (на этих же линиях лабораторных мышей) (Стариченко, Григоркина, 1991).

Этот факт может быть интерпретирован с принципиально других позиций. Согласно концепции лимитирующих морфофизиологических факторов обмена (ЛМФФ) (Любашевский, 1980; Стариченко, 2007; Стариченко, Любашевский, 2009), кинетика остеотропного вещества в скелете позвоночных зависит от системы из 11 ЛМФФ (два из них — площадь костных поверхностей и объем кости — частично проявляются через массу скелета). Массовые характеристики скелета мышей нескольких линий (BALB/c, CBA, C57BL/6, BC), изученные нами ранее, очень близки и могут служить индикатором сходства костных морфоструктур и интенсивности протекания метаболических процессов в скелете (Стариченко и др., 1993). Выявлено, что, несмотря на значимость различий

Таблица 3

Коэффициент внутрисемейной корреляции массовых показателей и концентрации ^{90}Sr у разновозрастных мышей линии CBA

Источник дисперсии	Эффект			Остаток		F	p≤	R
	Тип	df	MS	df	MS			
Масса тела								
Величина помета	Фиксированный	1	68,25	71,99	10,80	6,32	0,0142	–
Группа	Фиксированный	1	3955,03	73,58	10,36	381,70	0,0001	–
Пол	Фиксированный	1	445,09	271,40	3,44	129,33	0,0001	–
Возраст	Фиксированный	1	1747,47	72,89	10,55	165,68	0,0001	–
Семья	**Случайный**	76	9,78	353,00	2,19	4,46	0,0001	**0,391**
Масса бедренной кости								
Величина помета	Фиксированный	1	0,0041	72,60	0,00024	16,96	0,0001	–
Группа	Фиксированный	1	0,0865	73,95	0,00023	375,52	0,0001	–
Пол	Фиксированный	1	0,0020	243,67	0,00007	28,43	0,0001	–
Возраст	Фиксированный	1	0,0358	73,37	0,00023	152,60	0,0001	–
Семья	**Случайный**	76	0,0002	353,00	0,00004	5,28	0,0001	**0,443**
Концентрация ^{90}Sr								
Величина помета	Фиксированный	1	623389	73,31	197234	3,16	0,0796	–
Группа	Фиксированный	1	40476254	74,38	188501	214,73	0,0001	–
Пол	Фиксированный	1	348176	209,47	51320	6,78	0,0099	–
Возраст	Фиксированный	1	16459766	73,91	192176	85,65	0,0001	–
Семья	**Случайный**	76	176924	353,00	26543	6,67	0,0001	**0,513**

по абсолютным значениям, относительные (в % от массы скелета) величины оказались сходными, что подтвердило предположение об однородности скелетных отношений у всех использованных линий (Стариченко и др., 1993).

В данном исследовании впервые на линейных мышах был применен метод семейного анализа. Обнаружение значимой и сравнимой по своей выраженности внутрисемейной корреляции массовых и обменных показателей свидетельствует о наследственной детерминации метаболизма остеотропных токсических веществ. При этом использование в эксперименте с фтором сравнительной оценки вклада факторов «линия» и «семья» в общую наследственную компоненту изменчивости показало (Стариченко, 2007), что фактор «семья» обладает превалирующим действием, так как по сравнению с фактором «линия» его эффект в 2–3 раза выше как для морфологических, так и для метаболических характеристик.

Относительно характеристик массы полученные результаты согласуются с данными других авторов (Мина, Клевезаль, 1976; Никитюк, 1977; Мажуга, Хрисанфова, 1980; Фогель, Мотульски, 1990; Castle, 1941; Falconer, 1960; Roberts, 1965; Slemenda et al., 1996; и др.), исследовавших наследственную изменчивость массы и размеров тела у животных и человека и пришедших к выводу, что, несмотря на большие различия в оценках изменчивости, она достигает, а иногда и превышает 0,5, и мало различается у позвоночных разных систематических групп.

Для линейных животных, характеризующихся высокой степенью генетической однородности, факт межсемейной изменчивости можно объяснить как эпигенетической изменчивостью, так и остаточной гетерогенностью животных внутри линий (спонтанные мутации, ошибки разведения) (Ригер, Михаэлис, 1967; Дубинин, 1976; Аршавский, 1980; Бландова и др., 1983; Васильев, 2005; Grüneberg, 1952). Значительная морфологическая и метаболическая вариабельность среди мышей чистых линий (внутри линий) отмечена и другими авторами (Лебенгарц, 1989; Penet et al., 2006). К тому же при подборе животных для медико-биологических исследований обычно производится жесткая выбраковка особей, отличающихся по конституциональным показателям. Поскольку для целей данного эксперимента такой необходимости не было, мы использовали всех животных, полученных в ходе эксперимента.

Высокая внутрисемейная корреляция выявлена (Стариченко, Кшнясев, 2003; Стариченко, 2004; 2007) также для аккумуляции ^{90}Sr у обыкновенной слепушонки (*Ellobius talpinus Pallas*, 1770), обитающей в условиях хронического поступления ^{90}Sr (эпицентр ВУРСа, плотность загрязнения ^{90}Sr 37 МБк/м^2 ~ 1000 Ки/км^2) и характеризующейся подземным образом жизни, посе-

Таблица 4

Коэффициент внутрисемейной корреляции массовых показателей и концентрации фтора у одновозрастных мышей линий CBA, BALB/c и BC

Источник дисперсии	Эффект			Остаток		F	p≤	R
	Тип	df	MS	df	MS			
Масса тела								
Величина помета	Фиксированный	1	996,62	64,56	27,79	35,86	0,0001	–
Группа	Фиксированный	1	370,75	69,14	20,21	18,34	0,0001	–
Пол	Фиксированный	1	207,90	273,76	3,87	53,69	0,0001	–
Линия	Фиксированный	2	111,96	73,25	16,52	6,78	0,0020	–
Семья	**Случайный**	74	16,01	502,00	2,28	7,03	0,0001	**0,455**
Масса бедренной кости								
Величина помета	Фиксированный	1	631071,7	65,26	52363,93	12,05	0,0009	–
Группа	Фиксированный	1	179172,7	69,51	37982,57	4,72	0,0333	–
Пол	Фиксированный	1	52083,5	258,11	6971,25	7,47	0,0067	–
Линия	Фиксированный	2	275632,6	73,31	30980,45	8,90	0,0003	–
Семья	**Случайный**	74	30014,6	502,00	3944,81	7,61	0,0001	**0,478**
Логарифм концентрации фтора								
Величина помета	Фиксированный	1	1,23	63,29	0,51	2,42	0,1249	–
Группа	Фиксированный	1	930,99	68,48	0,37	2513,03	0,0001	–
Пол	Фиксированный	1	0,34	301,69	0,08	4,49	0,0350	–
Линия	Фиксированный	2	2,24	73,15	0,30	7,36	0,0012	–
Семья	**Случайный**	74	0,29	502,00	0,05	6,17	0,0001	**0,417**

мейной организацией поселений и крайне малой способностью к расселению.

При этом следует обсудить эффекты других факторов, на фоне которых проводили анализ. Так, уменьшение массовых показателей животных, содержавшихся на овсяной монодиете, совпадает с известным из литературы фактом замедления ростовых процессов в организме при несбалансированном рационе (Пархон, 1959; Касавина, Торбенко, 1979). Измельчание животных, развивавшихся на фоне поступления повышенных количеств фтора, может быть обусловлено как прямым угнетающим действием фтора в период самостоятельного питания, так и пре- и постнатальными эффектами воздействия фтора, прошедшего в кровь плода через плаценту во время беременности или поступившего с молоком матери (Габович, 1957; Книжников, 1975).

Межгрупповые различия в накоплении токсикантов связаны для фтора с уровнем его поступления (контроль — фоновое, опыт — повышенное), для ^{90}Sr — с различием возрастов и воздействием на протяжении длительного времени стрессирующего экзогенного фактора — овсяной монодиеты. Аккумуляция ^{90}Sr значимо выше у животных опытных групп, что соответствует данным других авторов об изменении поведения остеотропных радионуклидов под влиянием эндо- и экзогенных факторов, например, при изменении диеты и гормонального статуса организма (см. обзор Стариченко и др., 1993). Существование возрастной зависимости аккумуляции остеотропных радионуклидов в скелете позвоночных также неоднократно описано в литературе (Метаболизм стронция, 1971; Булдаков, 1990; Любашевский, 1980; Калистратова и др., 1996; Шведов, Аклеев, 2001; и др.).

Относительно влияния пола животных на величину накопления в скелете остеотропных веществ единого мнения нет. На сегодняшний день накоплены многочисленные данные об относительно небольшом влиянии половой принадлежности на депонирование абсолютного большинства остеотропных веществ, частью авторов существование половых особенностей обмена даже не обсуждается (Габович, 1957; Книжников, 1975; Stover et al., 1959; Momeni et al., 1976; Hefti, Marthaler, 1981; и др.). Исключение составляют период беременности и лактации, когда в организме самок происходят изменения в минеральном обмене (Ильенко, Крапивко, 1989; Баженов и др., 1990), а также время быстрого роста, когда формируется масса скелета — за счет полового диморфизма в размерах скелета (тела) (Толстых и др., 2001; Shagina et al., 2003).

Кажущееся противоречие в отсутствии влияния половой принадлежности животных на концентрацию фтора

внутри отдельных линий (табл. 2) и значимый ($p < 0,035$) эффект фактора «пол» на этот показатель при дисперсионном анализе (табл. 4) связан с укрупнением выборки, что ведет к увеличению чувствительности критерия. При анализе отдельно контрольной и опытной групп влияние фактора «пол» проявляется только в контроле ($p = 0,032$ и $p = 0,199$ соответственно) (Стариченко, Кшнясев, 2004). Во всех случаях эффект этого фактора на концентрацию токсикантов (по сравнению с другими факторами) самый небольшой.

Влияние ковариаты «величина помета», выявленное в обоих экспериментах только для массы тела и массы бедренной кости, подтверждает известный факт, что у многоплодных млекопитающих массовые показатели детенышей и их количество в помете имеют обратную зависимость (см. обзор Мина, Клевезаль, 1976). То есть все экспериментальные результаты, за исключением эффекта фактора «семья», для которого в доступной нам литературе материал для сравнения отсутствует, находятся в полном соответствии с данными других авторов.

Таким образом, впервые с помощью семейного анализа потомства линейных лабораторных мышей проведена оценка наследственной (семейной) компоненты изменчивости (внутрисемейной корреляции) кинетики остеотропных токсических веществ — ^{90}Sr (однократное введение) и стабильного фтора (хроническое поступление) — в сравнении с изменчивостью морфологических признаков (массы тела и массы бедренной кости), наследственная детеминированность которых доказана. Показано, что метаболизм остеотропных веществ в скелете позвоночных наследственно (семейно) обусловлен; наследственная компонента изменчивости обменных и морфологических характеристик находится в пределах 0,4–0,5 ($p \leq 0,0001$). Эти данные представляют существенный интерес при экстраполяции на человека, для которого вряд ли возможна более четкая экспериментальная оценка.

В практическом плане учет наследственной компоненты метаболизма остеотропных веществ является основой для прогноза их обмена в организме отдельных индивидов, входящих в группу риска при радиационных инцидентах или техногенных авариях (по способности к той или иной скорости депонирования), а также в случае преференции кандидатов при профессиональном отборе для работ в условиях патологических нагрузок на костно-суставную систему (например, при длительной гипокинезии, при хроническом поступлении фтора, свинца, бериллия и других остеотропных токсикантов). Этот же подход действителен при отборе сельскохозяйственных животных, пригодных к выпасу на загрязненных территориях (по потенциально низкому уровню аккумуляции). При этом особи с уменьшенным накоплением поллютанта представляют ценный материал для селекции.

Автор выражает благодарность к. б. н. И. А. Кшнясеву за помощь в статистической обработке материала, д. б. н. Н. М. Любашевскому и д. б. н. В. Н. Глотову — в обсуждении полученных результатов.

Литература

1. *Аршавский И. А.,* 1980. Физиологические механизмы внутривидовой изменчивости онтогенетических процессов у млекопитающих // Внутривидовая изменчивость в онтогенезе животных. М. С. 19–44.
2. *Баженов В. А., Булдаков Л. А., Василенко И. Я. и др.,* 1990. Вредные химические вещества. Радиоактивные вещества: справ. изд. Л.: Химия. 464 с.
3. *Беневоленская Л. И., Финогенова С.А.,* 1999. Генетика остеопороза: исследование значимости генетических факторов в детерминации заболевания: Обзор литературы // Остеопороз и остеопатии. № 2. С. 23–26.
4. *Бландова З. К., Душкин В. А., Малашенко А. М. и др.,* 1983. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. М.: Наука. 191 с.
5. *Булдаков Л. А.,* 1990. Радиоактивные вещества и человек. М.: Энергоатомиздат. 160 с.
6. *Васильев А. Г.,* 2005. Эпигенетические основы фенетики: на пути к популяционной мерономии. Екатеринбург: Академкнига. 640 с.
7. *Васильев А. Г., Васильева И. А., Любашевский Н. М., Стариченко В. И.,* 1986. Экспериментальное изучение устойчивости проявления неметрических пороговых признаков скелета у линейных мышей // Генетика. Т. 22. С. 1191–1198.
8. *Васильева И. А., Васильев А. Г., Любашевский Н. М., Стариченко В. И.,* 1988. Сравнение устойчивости морфометрических и неметрических характеристик скелета линейных мышей к средовым воздействиям в пренатальном развитии // Генетика. Т. 24. С. 1209–1214.
9. *Габович Р. Д.,* 1957. Фтор и его гигиеническое значение. М.: Медгиз. 250 с.
10. *Дубинин Н. П.,* 1976. Общая генетика. М.: Наука. 590 с.
11. *Журавлев В. Ф.,* 1990. Токсикология радиоактивных веществ. М.: Энергоатомиздат. 336 с.
12. *Ильенко А. И., Крапивко Т.П.,* 1989. Экология животных в радиационном биогеоценозе. М.: Наука. 224 с.
13. *Ильин Б. Н., Борисова В. В., Ветух В. А.,* 1991. Отдаленные биологические эффекты комбинированного действия радионуклидов различной тропности. М.: Энергоатомиздат. 160 с.
14. *Калистратова В. С., Заликин Г. А., Нисимов П. Г. и др.,* 1996. Биокинетика радионуклидов как функция возраста экспериментальных животных // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 36. С. 421–426.

15. *Касавина Б. С., Торбенко В. П.,* 1979. Жизнь костной ткани. М.: Наука. 176 с.
16. *Книжников В. А.,* 1975. Кальций и фтор: радиационно-гигиенические аспекты. М.: Атомиздат. 199 с.
17. *Лебенгарц Я. З.,* 1989. Взаимосвязь радиочувствительности и биохимического статуса крови у животных различного генотипа // I Всесоюзный радиобиологический съезд: тез. докл. Пущино, Т. 1. С. 210–211.
18. *Любашевский Н. М.,* 1980. Метаболизм радиоизотопов в скелете позвоночных. М.: Наука. 255 с.
19. *Любашевский Н. М., Токарь В. И., Щербаков С.В.,* 1996. Техногенное загрязнение окружающей среды фтором: (экологические и медико-социальные аспекты). Екатеринбург: УрО РАН. 239 с.
20. *Мажуга П. М., Хрисанфова Е. Н.,* 1980. Проблемы биологии человека. Киев: Наук. думка. 328 с.
21. Метаболизм стронция: сб. ст.: пер. с англ., 1971 / под ред. В. А. Книжникова, А. А. Моисеева. М.: Атомиздат. 344 с.
22. *Мина М. В., Клевезаль Г. А.,* 1976. Рост животных. М.: Наука. 292 с.
23. *Никитюк Б. А.,* 1977. Соотносительная роль наследственных и средовых влияний на темпы возрастных изменений морфологических признаков // Эволюция темпов индивидуального развития животных. М. С. 83–94.
24. *Оганов В. С.,* 2003. Костная система, невесомость и остеопороз. М.: Слово. 260 с.
25. *Пархон К. И.,* 1959. Возрастная биология. Клинические и экспериментальные исследования. Бухарест: Изд-во иностр. лит. 467 с.
26. *Поспишил М., Ваха И.,* 1986. Индивидуальная радиочувствительность, ее механизмы и проявления. М.: Энергоатомиздат. 112 с.
27. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: прил. к приказу Мин-ва здравоохранения СССР от 12 авг. 1977 г., № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». 1977. URL: http://gene-on-gene. narod. ru/Rules/animals. htm (дата обращения: 11. 01. 10).
28. *Ригер Р., Михаэлис А. М.,* 1967. Генетический и цитогенетический словарь: пер. с нем. М.: Колос. 607 с.
29. *Стариченко В. И.,* 2000. Индивидуальная изменчивость депонирования ^{90}Sr и ее вариабельность в зависимости от генотипической однородности выборки // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 40. С. 451–455.
30. *Стариченко В. И.,* 2004. Накопление ^{90}Sr в костной ткани обыкновенной слепушонки, обитающей в головной части ВУРСа // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 44. С. 370–374.
31. *Стариченко В. И.,* 2005. Кинетика ^{90}Sr: генотипическая детерминация // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 45. С. 328–332.
32. *Стариченко В. И.,* 2007. Индивидуальные особенности кинетики остеотропных веществ: Автореф. докт. дис. Челябинск. 50 с.
33. *Стариченко В. И.,* 2009. Индивидуальная изменчивость депонирования остеотропных веществ: актуальность проблемы // Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека: материалы III Междунар. конф. Томск: STT. С. 547–552.
34. *Стариченко В. И., Григоркина Е. Б.,* 1991. Индивидуальная изменчивость радиочувствительности и скелетного метаболизма радионуклидов // Очерки по экологической диагностике. Свердловск: УрО АН СССР. С. 21–30.
35. *Стариченко В. И., Кшнясев И. А.,* 2003. Оценка влияния эндогенных факторов на накопление ^{90}Sr в костной ткани обыкновенной слепушонки на ВУРСе // Радиационная безопасность территорий. Радиоэкология города: Междунар. конф. М.: Изд-во Российского университета дружбы народов. С. 64–67.
36. *Стариченко В. И., Кшнясев И. А.,* 2004. Генотипическая детерминанта кинетики фтора у линейных мышей // Токсикологический вестник. № 6. С. 21–26.
37. *Стариченко В. И., Любашевский Н. М.,* 2009. Метаболизм радионуклидов в костной ткани (базовые проблемы радиоизотопной диагностики) // Материалы науч. конф. «Исследования в области управления и диагностики». Арад (Израиль). С. 137–146.
38. *Стариченко В. И., Любашевский Н. М., Попов Б. В.,* 1993. Индивидуальная изменчивость метаболизма остеотропных токсических веществ. Екатеринбург: Наука. 168 с.
39. *Степина В. И., Любашевский Н. М., Гайсина Ф. М.,* 1973. Применение радиоактивного изотопа для оценки гомеостаза кальция при экстремальных воздействиях // Новые направления применения изотопов в медицине: материалы к докл. III зон. конф. по применению изотопов в нар. хоз-ве Урала. Свердловск. С. 57–59.
40. *Толстых Е. И., Дегтева М. О., Кожеуров В. П., Вьюшкова О. В.,* 2001. Некоторые аспекты метаболизма стронция у человека в связи с радиационным загрязнением окружающей среды // Проблемы радиоэкологии и пограничных дисциплин. Заречный. Вып. 4. С. 270–279.
41. *Фогель Ф., Мотульски А.,* 1990. Генетика человека: Проблемы и подходы: пер. с англ.: в 3 т. М.: Мир. Т. 2. 378 с.
42. *Шагина Н. Б., Дегтева М. О., Толстых Е. И. и др.,* 2006. Снижение неопределенностей доз внутреннего облучения от ^{90}Sr для расширенной когорты реки Теча // Вопросы радиационной безопасности. № 1. С. 5–25.
43. *Шведов В. Л.,* 1965. Сравнительная радиочувствительность генетически различных линий мышей к ^{90}Sr // Медицинская радиология. № 2. С. 48–51.

44. *Шведов В. Л., Аклеев А. В.,* 2001. Радиобиология стронция-90. Челябинск: УНПЦ РМ. 298 с.
45. *Castle W. E.,* 1941. Influence of certain color mutations on body size in mice, rats and rabbits // Genetics. Vol. 26. P. 177–191.
46. *Falconer D. S.,* 1960. Introduction to quantitative genetics. Edinburgh; London. 365 P.
47. *Grüneberg H.,* 1952. Genetical studies on the skeleton of the mouse IV. Quasi-continuous variations // J. Genet. Vol. 51. P. 95–114.
48. *Hefti A., Marthaler T. M.,* 1981. Bone fluoride concentrations after 16 years of drinking water fluoridation // Caries Res. Vol. 15. P. 85–89.
49. *Likhtarev I. A., Dobroskok I. A., Ilyin L. A. et al.,* 1975. A study of certain characteristics of strontium metabolism in a homogeneous group of human subjects // Health Phys. Vol. 28. P. 49–60.
50. *Momeni M. H., Rosenblatt L. S., Jow N.,* 1976. Retention and distribution of ^{226}Ra in beagles // Health Phys. Vol. 30. P. 369–380.
51. *Penet M. F., Laigle C., Fur Y. L. et al.,* 2006. *In vivo* characterization of brain morphometric and metabolic endophenotypes in three inbred strains of mice using magnetic resonance techniques // Behav. Genet. Vol. 36. P. 732–744.
52. *Ralston S. H., Crombrugghe B.,* 2006. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis // Genes & development. Vol. 20. P. 2492–2506.
53. *Roberts R. C.,* 1965. Some contributions of the laboratory mouse to animal breeding research. Pt. I // Animal. Breed. Abstr. Vol. 33. P. 339–353.
54. *Roderick T. H.,* 1963. The response of twenty-seven inbred strains of mice to daily doses of whole-body X-irradiation // Radiat. Res. Vol. 20. P. 631–639.
55. *Shagina N. B., Tolstykh E. I., Degteva M. O.,* 2003. Improvements in the biokinetic model for strontium with allowance for age and gender differences in bone mineral metabolism // Rad. Prot. Dosimetry. Vol. 105. P. 619–622.
56. *Slemenda C. W., Turner C. H., Peacock M. et al.,* 1996. The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density // Osteoporosis Int. Vol. 6. P. 178–182.
57. *Sokal R. R., Rohlf F. J.,* 1995. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research, 3-th ed. New York: W. H. Freeman & Co. 888 p.
58. *Storer J. B.,* 1966. Acute responses to ionizing radiation // Biology of the laboratory mouse / Ed. E. L. Green. New York: McGraw-Hill. P. 427–446.
59. *Stover B. J., Atherton D. R., Keller N.,* 1959. Metabolism of Pu^{239} in adult beagle dogs // Radiat. Res. Vol. 10. P. 130–147.
60. *Thomas R. G., Healy J. W., McInroy J. F.,* 1984. Plutonium partitioning among internal organs // Health Phys. Vol. 46. P. 839–844.

METABOLISM OF OSTEOTROPIC TOXICAL SUBSTANCES: HEREDITARY DETERMINATION

Starichenko V. I.

❀ **SUMMARY: The hereditary component of the variability (intrafamily correlation) of the metabolism of osteotropic toxical substances — ^{90}Sr (a single injection) and stable fluorine (a chronic entering) were evaluated in laboratory linear mice in comparison with correlation of the morphological signs, hereditary of development of which is known. The evaluation was made with the control of the effects of sex, age and linear membership of animals and also taking into account the conditions of their development and the size of offspring. Significant intrafamily correlation of the concentration of ^{90}Sr and of fluorine in bone tissue was revealed ($r = 0,4–0,5$; $p < 0,0001$). It can be compared with the correlation of morphological signs, which is the evidence of hereditary determinacy of the metabolism of osteotropic toxical substances.**

❀ **KEY WORDS:** osteotropic substances (^{90}Sr, fluorine); bone tissue; linear mice; family analysis; analysis of variance; coefficient of intraclass correlation.

❀ Информация об авторах

Стариченко Вера Ивановна — ведущий научный сотрудник, доцент, д. б. н.
Институт экологии растений и животных УрО РАН,
Екатеринбург 620144, ул. 8 Марта, 202.
E-mail: starichenko@ipae.uran.ru.

Starichenko Vera Iivanovna —leading researcher, docent, doctor of biological science. Institute of Plant and Animal Ecology, Russian Academy of Sciences, Ural Division.
8 Marta str., 202, Ekaterinburg, 620144, Russia.
E-mail: starichenko@ipae.uran.ru.

УДК 575:577.152-355:581.132

© Е. М. Чекунова

Кафедра генетики и селекции биолого-почвенного факультета СПбГУ, Санкт-Петербург

ГЕНЕТИКА БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА: ТЕМНОВОЙ И СВЕТОЗАВИСИМЫЙ ПУТИ

❀ **В обзоре изложены результаты генетических, молекулярно-биологических и биохимических исследований двух протохлорофиллид-оксидоредуктаз (ПОР) — ферментов, обеспечивающих светозависимый (сПОР) и темновой (тПОР) пути восстановления протохлорофиллида в процессе биосинтеза хлорофилла. Обсуждаются эволюционные аспекты их происхождения и функционирования. Основное внимание уделено генетике наиболее древнего темнового биосинтеза хлорофилла.**

❀ **Ключевые слова**: биосинтез хлорофилла; восстановление протохлорофиллида.

Поступила в редакцию 20.11.2009.
Принята к публикации 05.07.2010.

Принятые сокращения:
сПОР — светозависимая протохлорофиллид-оксидоредуктаза;
тПОР — темновая протохлорофиллид-оксидоредуктаза;
ПХЛД — протохлорофилллид;
ХЛД — хлорофиллид;
ФС — фотосистема;
ХЛ — хлорофилл;
БХЛ — бактериохлорофилл;
ОРС — открытая рамка считывания.

ВВЕДЕНИЕ

Фототрофные бактерии и пластиды содержат тетрапиррольные пигменты — бактериохлорофиллы **(БХЛ)** и хлорофиллы **(ХЛ)**, обеспечивающие процессы фотосинтеза (Шестаков, 1998). Аноксигенные бактерии синтезируют их в темноте, цианобактерии — на свету и в темноте, а покрытосеменные растения — только на свету. Способность к светонезависимому и/или светозависимому образованию ХЛ или БХЛ обеспечивается ферментами, катализирующими превращение протохлорофиллида **(ПХЛД)** в хлорофиллид **(ХЛД)**. В эволюции сформировалось два пути осуществления этой реакции. Один из них связан с использованием не зависящей от света, или темновой протохлорофиллид-оксидоредуктазы **(тПОР)**. В свою очередь, светозависимое образование ХЛД осуществляет НАДФН: протохлорофиллид оксидоредуктаза **(сПОР)**. Современные представления о генетической детерминации, происхождении и функционировании этих ферментов коротко изложены в настоящем обзоре.

1. БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА

ПХЛД — последний общий биосинтетический предшественник ХЛ и БХЛ, двух структурно родственных пигментов, которые различаются, в частности, природой боковых цепей при атомах углерода тетрапиррольного макроцикла (рис. 1). Они поглощают свет и участвуют в разделении зарядов поперек энергосопрягающих биомембран, что является основой аноксигенной фототрофии у бактерий, синтезирующих БХЛ, и оксигенной фототрофии у цианобактерий, прохлорофитов, водорослей и высших растений. *In vivo* ХЛ и БХЛ существуют в форме нековалентно связанных хромофоров пигмент-белковых комплексов светособирающих антенн и реакционных центров (Пиневич, Аверина, 2002).

Биосинтез тетрапирролов у фототрофных организмов осуществляется через цепочку биохимических реакций, катализируемых как растворимыми, так и мембраносвязанными ферментами. Путь превращения тетрапиррольного макроцикла протопорфирина IX (ПП), последнего обще-

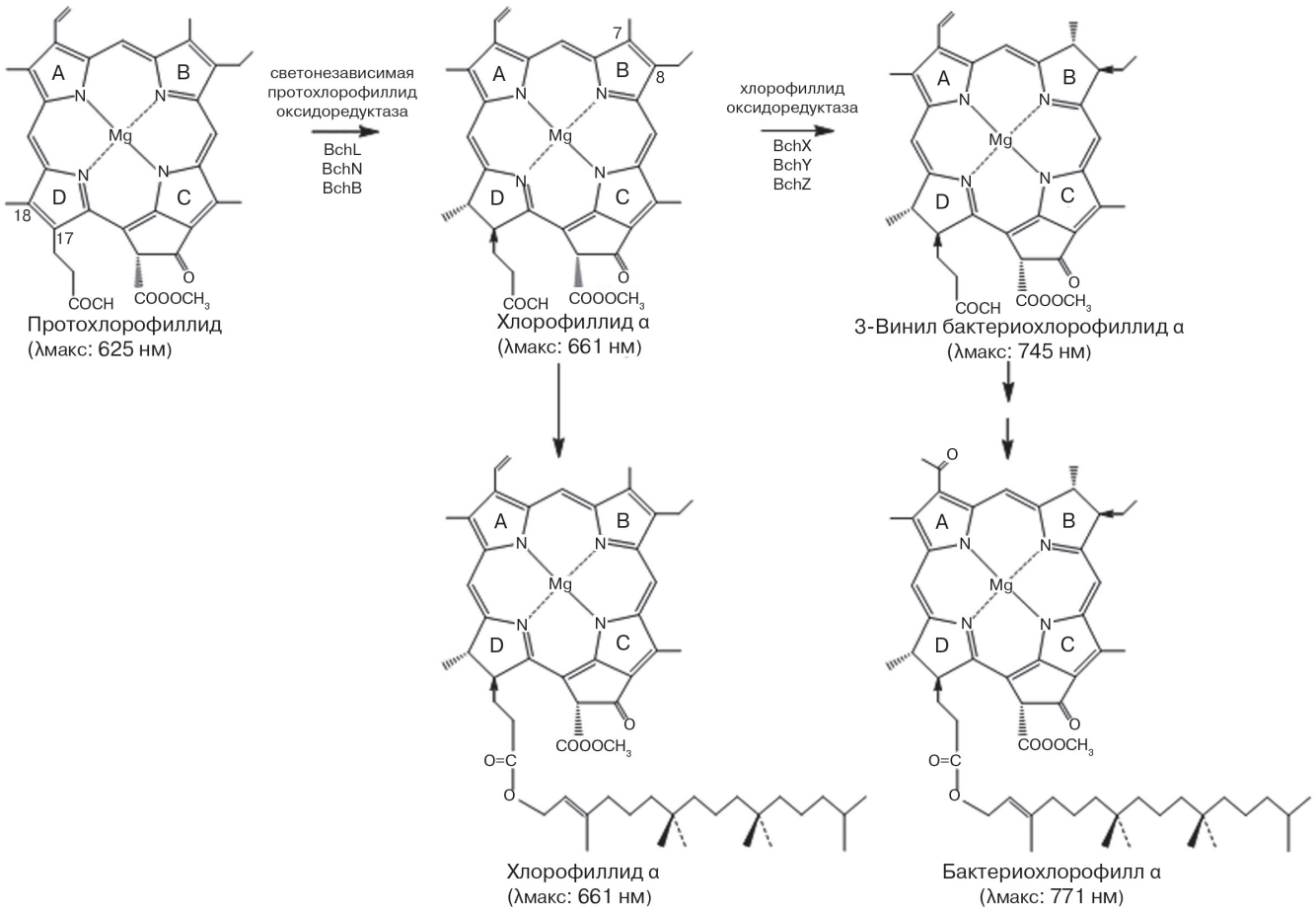

Рис. 1. Синтез хлорофилла и бактериохлорофилла из протохлорофиллида.
У аноксигенной бактерии *R. capsulatus* циклический тетрапиррол ПХЛД превращается в ХЛД в результате восстановления двойной связи в положении $C_{17}-C_{18}$ в кольце D макроцикла ферментом тПОР, состоящим из трех субъединиц: BchLNB. Далее комплекс ХЛД-оксидоредуктазы BchXYZ, восстанавливает двойную связь в кольце B (C_7-C_8) с образованием бактериохлорофиллида, из которого синтезируется БХЛ a. Из ХЛД a у оксигенных фотосинтетиков после присоединения фитола образуется ХЛ a. В скобках указаны максимумы в спектрах поглощения пигментов

го биосинтетического предшественника ХЛ и гема, в Mg-протопорфирин IX и далее через ряд интермедиатов, в ХЛ или БХЛ, известный как магниевая ветвь биосинтеза тетрапирролов (рис. 2), характерен для всех фототрофных организмов (Reinbothe, Reinbothe, 1996). Мишенью световой регуляции этого пути служит ПХЛД. *In vivo* пигмент существует в двух формах: дивинил-ПХЛД и моновинил-ПХЛД, соотношение которых варьирует у разных организмов и зависит от внешних условий и стадии онтогенеза. Биологическая целесообразность гетерогенности этих молекул до сих пор не ясна (Беляева, 2009).

ПХЛД — субстрат реакции, которая заключается в восстановлении двойной связи в четвертом кольце молекулы в положении $C_{17}-C_{18}$ (рис. 1). Эта реакция может проходить в темноте и на свету. Светозависимое восстановление ПХЛД свойственно оксигенным фототрофам. Темновой и светозависимый биосинтез ХЛ сосуществуют у многих организмов, в том числе цианобактерий, водорослей и голосеменных растений. Покрытосеменные растения не образуют ХЛ в темноте. Эта способность утеряна и у таких голосеменных, как реликтовое листопадное дерево *Ginkgo biloba*, тропическая лиана *Gnetum ula* и растущая в пустынях *Welwitschia mirabilis*, а также у папоротника *Psilotum nudum*, зеленой водоросли *Euglena gracilis* и красной водоросли *Cyanidium caldarum*. Большинство аноксигенных фототрофов, включая пурпурные и зеленые бактерии, образуют БХЛ только в темноте (Armstrong, 1998).

У организмов, синтезирующих ХЛ в темноте, качественные и количественные характеристики этого процесса сильно варьируют в зависимости от стадии развития и внешних условий. Активный темновой биосинтез ХЛ, характерный для взрослых голосеменных растений, значительно снижен у их проростков (Wettstein et al., 1995). Первичные иголочки секвойи *(Metasequoia glyptostroboides)* и вторичные иголочки европейской пинии *(Pinus pinea)* сохранили способность зеленеть в

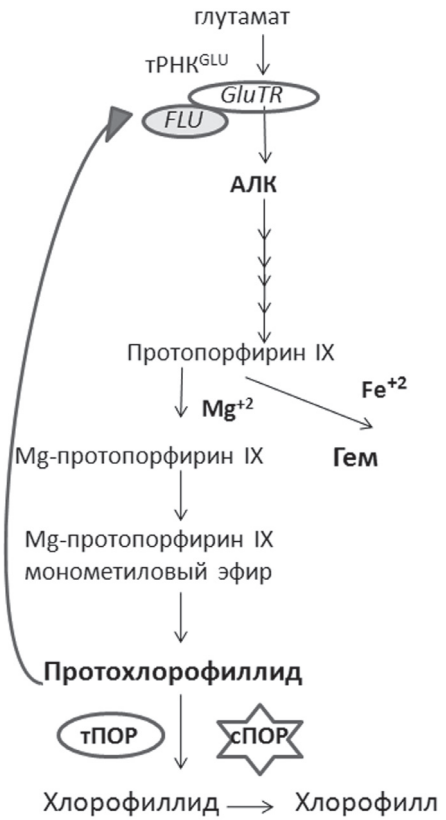

Рис. 2. Схема биосинтеза хлорофилла в фотосинтезирующей клетке.
Пигмент синтезируется из глутамата через серию ферментативных реакций, показанных стрелками. АЛК — 5-аминолевулиновая кислота — ключевой интермедиат биосинтеза. Стрелка указывает механизм регуляции биосинтеза ХЛ: протохлорофиллид через белок FLU репрессирует GluTR-глутамат-тРНК-редуктазу (Meskauskiene R., Apel K., 2002)

темноте (Laudi, Manzini, 1975; Ou, Adamson, 1995), тогда как проростки некоторых видов лиственниц, например *Larix decidua*, ее практически утратили (Mariani et al., 1990).

2. СВЕТОНЕЗАВИСИМЫЙ БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Доказательства существования двух путей восстановления ПХЛД: желтые в темноте (yellow) мутанты зеленых водорослей

Предположение о наличии нескольких механизмов, обеспечивающих восстановление ПХЛД в процессе биосинтеза ХЛ, было высказано еще в начале 50-х годов XX века при изучении разных видов зеленых водорослей. Классический генетический анализ позволил выявить довольно обширный класс так называемых желтых (yellow) мутантов с нарушенным темновым синтезом ХЛ, которые имели желтую окраску при выращивании в темноте, но подобно этиолированным проросткам высших растений, зеленели при освещении. Их пигментация в темноте обусловлена отсутствием ХЛ, накоплением ПХЛД и наличием желтых каротиноидов. Мутанты yellow были получены у ряда зеленых водорослей, в том числе *Chlorella*, *Scenedesmus* (Bogorad, 1976), а также *Chlamydomonas reinhardtii*, в ядерном геноме которой идентифицированы 7 локусов, мутации в которых приводят к появлению подобного фенотипа (Sager, 1955; Ford, Wang, 1980; 1980a). Сейчас известно, что кодируемые этими генами белки не входят в состав ферментного комплекса тПОР (см. раздел 2.4). Тем не менее, эксперименты, в которых было показано, что способность мутантов yellow хламидомонады зеленеть на свету может быть блокирована ядерной мутацией pc-1, послужили поводом говорить о сосуществовании двух генетически различных (светозависимого и светонезависимого) путей восстановления ПХЛД (Ford et al., 1981).

2.2. Светонезависимое восстановление протохлорофиллида у аноксигенных фототрофных бактерий обеспечивается продуктами генов *bchB, bchL и bchN*

Основные сведения о генетическом контроле темнового биосинтеза ХЛД из ПХЛД были получены при анализе пигментных мутантов бактерий рода *Rhodobacter*. Эти несерные пурпурные бактерии способны к аноксигенному фотосинтезу и независимо от света образуют БХЛа. Мутанты факультативных фототрофов *R. sphaeroides* и *R. capsulatus* с разными дефектами фотосинтеза и биосинтеза пигментов стали предметом генетического анализа, в результате которого был выявлен участок хромосомы протяженностью в 46 тпн, названный «фотосинтетическим генным кластером». Он состоит более чем из 40 генов, отвечающих за фотосинтетические функции (Zsebo, Hearst, 1984), и содержит всю генетическую информацию, необходимую для синтеза БХЛ из протопорфирина IX (рис. 3А). Среди индуцированных пигментных мутантов *R. capsulatus* были и бесхлорофильные штаммы, накапливающие ПХЛД. Их молекулярно-генетический анализ позволил найти три гена — *bchB, bchL* и *bchN*, мутации по которым блокируют темновое восстановление ПХЛД (Burke et al., 1993), и предположить, что кодируемые ими полипептиды являются субъединицами фермента, получившего называние темновой (не зависящей от света) оксидоредуктазы (тПОР). При этом выяснилось, что ген *bchL* кодирует белок, гомологичный субъединице NifH нитрогеназы бактерий (Hearst et al., 1985).

2.3. Хлоропластный ген *frxC* — поиски функций

Одну из проблем не зависящего от света биосинтеза ХЛ удалось решить при сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей пластидных геномов печеночника *Marchantia polymorpha* и двух представителей покрытосеменных растений — табака *Nicotiana*

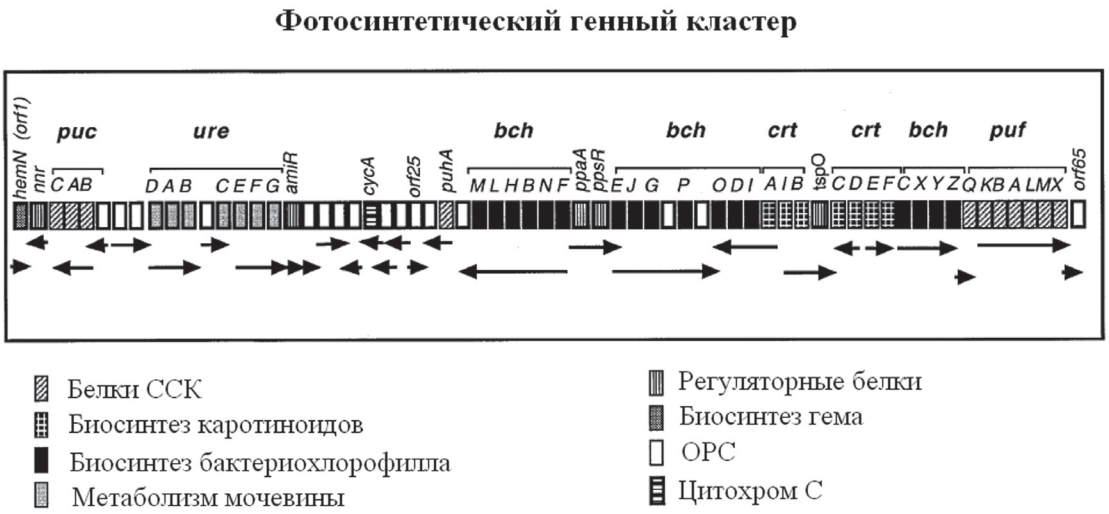

Рис. 3А. Фотосинтетический генный кластер *R. sphaeroides* 2.4 (по: Choundhary, Kaplan, 2000). Черным цветом обозначены гены биосинтеза бактериохлорофилла (bch). Стрелками показано направление транскрипции указанных генов

tabacum и риса *Oryza sativa*. Большинство из них были сходными, но ОРС, первоначально названную *frxC* благодаря структурному сходству продукта этого гена с ферредоксином бактерий, удалось найти только в пластидном геноме *M. polymorpha* (Ohyama et al., 1986). Она оказалась гомологичной гену *R. capsulatus*, кодирующему NifH — γ-субъединицу нитрогеназы (Fujita et al., 1989). Присутствие гена *frxC* в пластидном геноме печеночника казалось парадоксом, поскольку ядерные организмы не способны фиксировать молекулярный азот. В дальнейшем, когда ортологи гена *frxC* были обнаружены в пластидных геномах зеленеющих в темноте растений — нескольких видов сосны и зеленой водоросли *C. reinhardtii*, появились предположения, что продукты этих генов вовлечены не в процесс фиксации азота, а необходимы для не зависящего от света восстановления ПХЛД (Lindholm, Gustafsson, 1991; Huang, Liu, 1992).

2.4. Некоторые пластидные геномы содержат гены, кодирующие ПОР

Существенную роль в изучении генетического контроля темнового биосинтеза ХЛ сыграли мутанты yellow хламидомонады. Помимо ядерных мутаций (см. раздел 2.1), у нее была описана хлоропластная мутация, приводящая к фенотипу yellow (Александрова, 1979). В дальнейшем подобные мутанты получали в результате инсерционного мутагенеза (Roitgrund, Mets, 1990). Ортологи одного из таких делетированных хлоропластных генов хламидомонады *gidA* (сокр. англ. no green-in-the-dark) вскоре были найдены в пластидных геномах нескольких видов сосны, где они оказались сцепленными с геном *frxC* (Lindholm, Gustafsson, 1991). Сходное взаимное расположение этих генов (рис. 3Б) было установлено в пластидном геноме *M. polymorpha* и на хромосоме цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC6803 (Ogura et al., 1992). Прямое участие генов *frxC (chlL)* и *gidA (chlN)* в темновом биосинтезе ХЛ удалось показать при анализе фенотипов инсерционных мутантов *C. reinhardtii* (Suzuki, Bauer, 1992; Choquet et al., 1992) и азотфиксирующей цианобактерии *Plectonema boryanum* (Lyngbya sp. PCC7419) (Fujita et al., 1992; 1993). Более того, как и в случае с гомологией продукта гена *chlL* и полипептида NifH (см. разделы 2.1 и 2.2) было установлено, что белок, кодируемый геном *chlN*, имеет высокую степень сходства с белками NifD и NifK (α- и β-субъединицами MoFe-белка нитрогеназы бактерий (Fujita et al., 1993).

В 1993 г. в пластидных геномах *M. polymorpha* и *C. reinhardtii* были обнаружены ортологи гена *bchB (chlB) R. capsulatus*. Функциональный анализ инсерционных мутантов хламидомонады и цианобактерий по этому гену показал, что белок, кодируемый геном *chlB*, необходим для восстановления ПХЛД в темноте, а его первичная структура имеет сходство с аминокислотной последовательностью белков NifK и ChlN (Li et al., 1993, Fujita et al., 1996).

2.5. Способность зеленеть в темноте коррелирует с наличием генов *chlB, chlL* и *chlN* в хлоропластных геномах

Коль скоро было установлено, что хлоропластные гены: *chlB, chlL* и *chlN* контролируют не зависящее от света восстановление ПХЛД, возник вопрос, коррелирует ли наличие этих генов со способностью образовывать ХЛ в темноте. ДНК-ДНК гибридизация, основанные на ПЦР методы идентификации определенных участков ДНК и прямое сравнение нуклеотидных последовательностей хлоропластных геномов — все эти методы были использованы для поисков генов *chlB, chlL* и *chlN*

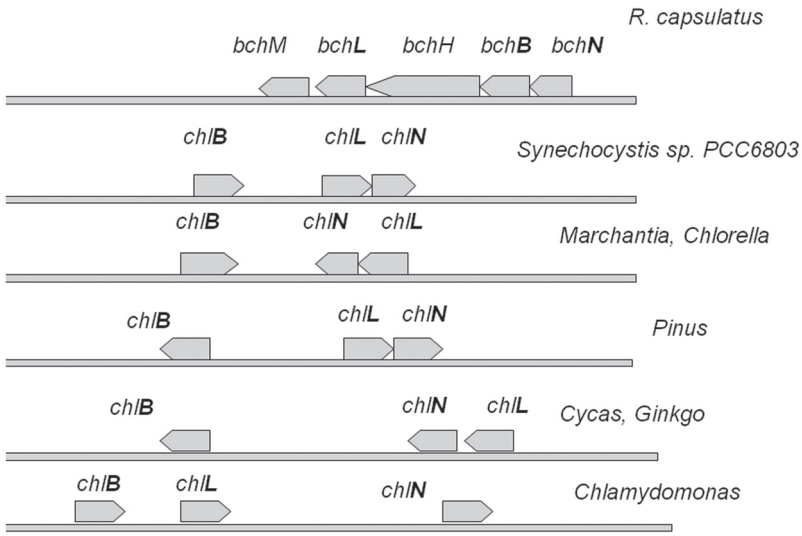

Рис. 3Б. Структурное расположение генов, кодирующих тПОР.
На диаграмме представлены ориентация и взаиморасположение генов тПОР в хромосомах аноксигенных бактерий *(bchB, bchL, bchN)*, оксигенных бактерий и в хлоропластных геномах ядерных фототрофов *(chlB, chlL chlN)*, синтезирующих хлорофилл в темноте. Гены *bchH* и *bchM* кодируют Н-субъединицу магний-хелатазы и фермент магний-протопорфирин IX метилтрансферазу

у различных фотосинтезирующих организмов. В геномах всех изученных к настоящему времени покрытосеменных растений их не обнаружили. В то же время они найдены в хлоропластной ДНК голосеменных растений (за исключением не способных зеленеть в темноте представителей семейства гнетофитов — *Gnetum gnemon* и *W. mirabilis*), папоротникообразных (кроме усатых папоротников) и водорослей. Не оказалось этих генов у *E. gracilis* и бурой водоросли *Odontella sinensis*, которые не синтезируют ХЛ в темноте (Armstrong, 1998). Таким образом, выяснилось, что для темнового синтеза ХЛД из ПХЛД необходимо наличие в хлоропластных геномах генов *chlB, chlL* и *chlN*. Это правило оказалось неприменимым только к реликтовому представителю голосеменных *G. biloba*, проростки и листья которого не способны зеленеть в темноте, несмотря на наличие всех трех генов (Richard et al., 1994; McCoy et al., 2008). Объяснения этому феномену до сих пор не найдено.

2.6. Регуляция синтеза тПОР

Данные о регуляции экспрессии генов, кодирующих субъединицы тПОР, пока очень фрагментарны и сильно различаются в зависимости от таксономической принадлежности изучаемого организма.

Транскрипция гена *chlL* у цианобактерии *P. boranyum* имеет место только при подавлении нитрогеназной активности (Fujita et al., 1991). Этот факт позволил заключить, что связанный азот и (или) молекулярный кислород, которые ингибируют фиксацию азота — необходимые предпосылки экспрессии этого гена у цианобактерий.

Транскрипты хлоропластных генов *chlB, chlL* и *chlN* хламидомонады одинаково присутствуют в клетках дикого типа и мутантов yellow, растущих и на свету, и в темноте, хотя уровень их накопления на свету оказывается в 2–4 раза выше. Белки ChlN и ChlB также выявляются в сходных количествах в клетках дикого типа и мутантов yellow, растущих и на свету и в темноте, а белок ChlL — только у дикого типа в темноте. Ядерные мутанты не содержат белка ChlL за исключением мутанта y-7, который синтезирует иммунореактивный полипептид меньшего размера (Cahoon, Timko, 2000). На основе этих результатов был сделан вывод, что у *C. reinhardtii* синтез белка *ChlL* негативно регулируется светом, а ядерные гены yellow контролируют его образование или накопление.

В клетках *M. paleacea*, которые одинаково хорошо зеленеют в темноте и при освещении, содержание мРНК генов *chlB, chlL* и *chlN* не зависит от света (Takio, Satoh, 1995). Повышенный уровень их транскриптов на свету был обнаружен только в клеточных линиях, не синтезирующих ХЛ в темноте, т. е. в условиях, когда возможен процесс зеленения.

Изучение регуляции темнового биосинтеза ХЛ у зеленых в темноте проростков ели *Picea abies* и лиственницы *L. decidua*, способных накапливать ХЛ в темноте только на ранних стадиях онтогенеза, показало, что у обоих видов гены, кодирующие тПОР, экспрессируются конститутивно. Различия были найдены на уровне белков — пожелтение проростков лиственницы оказалось связанным со снижением уровня содержания белка CHLB (Demko et al., 2009).

2.7. тПОР сходны с нитрогеназами бактерий

Структура тПОР консервативна, она сохранялась в течение миллиардов лет эволюции. Идентичность аминокислотной последовательности белков BchL, BchB и BchN у *R. capsulatus* с тПОР цианобактерий, зеленых водорослей, папоротникообразных и голосеменных растений составляет 30–60 %. При этом они имеют значи-

тельное сходство с субъединицами нитрогеназы эубактерий NifHDK (Fujita, Bauer, 2000).

Нитрогеназа — это чувствительный к кислороду ферментный комплекс, который восстанавливает молекулярный азот с использованием АТФ и донора электронов:

$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16АТФ \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16АДФ + 16Ф$.

Голофермент состоит из двух компонентов: Fe-белка и MoFe-белка. Fe-белок — это электрондонорный гомодимер, кодируемый геном *nifH*, который имеет два MgАТФ-связывающих сайта и содержит чувствительный к кислороду $[Fe_4S_4]$-кластер, лигандированный четырьмя остатками цистеина, по два от каждого мономера. MoFe-белок представляет собой гетеротетрамер, состоящий из субъединиц NifDK. Каждая пара субъединиц содержит P-кластер $[Fe_8S_8]$ и Fe-Mo кофактор $[Fe_7MoS_9]$. Донором электронов служит восстановленный ферредоксин. Вслед за гидролизом молекул MgАТФ Fe-белок переносит электроны от ферредоксина через P-кластеры к Mo-содержащим редокс-центрам тетрамера $NifD_2K_2$, а тот, в свою очередь, трижды отдает пару электронов молекуле субстрата, восстанававливая ее до двух молекул аммиака (Rubio, Ludden, 2005).

При обилии генетических и молекулярно-генетических данных о не зависящем от света восстановлении ПХЛД, полученных в течение последних 50 лет, исследования биохимии этого процесса начались сравнительно недавно. Из *R. capsulatus* удалось изолировать тПОР, и ее активность была изучена *in vitro*. Экстракты субъединиц тПОР получали в результате сверхэкспрессии генов *bchL* и *bchN-B*, введенных в геном *R. capsulatus* с помощью сконструированных плазмид (Nomata et al., 2005). Их анализ показал, что фермент состоит из двух компонентов — гомодимера L $(BchL)_2$ и гетеротетрамера NB $(BchN)_2(BchB)_2$, и для его активности необходимы АТФ и донор электронов. В соответствии с недавно установленной кристаллической структурой тПОР *R. cupsulatus*, каждая каталитическая единица BchN-BchB содержит один ПХЛД и один $[Fe_4S_4]$ кластер, лигандированный остатком аспартата и тремя цистеинами остатками (Muraki et. al., 2010). В присутствии АТФ L-белок $(BchL)_2$ передает 2 электрона от ферредоксина на NB-белок $(BchN\text{-}BchB)_2$, который содержит каталитический сайт для восстановления ПХЛД. Пространственная структура NB кластера и ПХЛД оказались соответственно идентичными P-кластеру и Fe-Mo кофактору в MoFe-белке нитрогеназы. Сходство пространственных структур обоих ферментов свидетельствует, что субъединицы ChlL, ChlB и ChlN оказались функционально сходными с субъединицами нитрогеназы бактерий NifH, NifK и NifD.

Так же, как нитрогеназа, тПОР цианобактерий чувствительна к кислороду. В опытах *in vitro* O_2 ингибировал активность белков ChlL и ChlN-ChlB в течение 5 и 30 минут (Yamamoto et al., 2009). По-видимому, оксигенные фототрофы научились защищать тПОР от воздействия O_2, и природу соответствующих регуляторных механизмов еще предстоит выяснить.

У пурпурной бактерии *R. capsulatus* известен еще один фермент, похожий на нитрогеназу — это хлорофиллид-оксидоредуктаза (ХОР), кодируемая генами *bchXYZ* (рис. 1), которая превращает ХЛД а в БХЛ а (Nomata, 2006). Аминокислотная последовательность полипептида BchX сходна с аминокислотной последовательностью субъединицы нитрогеназы NifH и имеет 32 % идентичности с продуктом гена *bchL*. Более того, BchY и BchZ — две другие субъединицы ХОР — гомологичны белкам BchN/ChlN и BchB/ChlB, соответственно. Структурное и функциональное сходство ферментных комплексов тПОР (BchL, N, B) и ХОР (BchX, Y, Z) у *R. capsulatus* дает основания говорить об их общем происхождении. Вероятно, они появились в результате дупликации и дивергенции предковых генов, кодировавших менее специфичные по отношению к субстрату ферменты, способные восстанавливать ПХЛД (Raymond et al., 2004).

3. СВЕТОЗАВИСИМЫЙ БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛИДА

Проростки высших растений, выращенные в темноте, окрашены в желтый цвет и морфологически отличаются от зеленых, растущих на свету. Их хлоропласты не содержат тилакоидов и ХЛ, биосинтез которого прерывается на стадии образования ПХЛД, и представляют собой этиопласты с проламеллярным телом и отходящими от него протилакоидами. В темноте в них аккумулируются комплексы: ПХЛД-НАДФН-сПОР. Свет запускает процесс зеленения этиолированных проростков: ПХЛД превращается в ХЛД и далее в ХЛ, и происходит дифференциация этиопластов в хлоропласты, когда проламеллярные тела и протилакоиды трансформируются в тилакоиды с развитой ламеллярной системой. Стартовым механизмом этих структурно-функциональных изменений служит рецепция света сПОР. К настоящему времени он довольно подробно изучен (Lebedev, Timko, 1998; Беляева, 2009), и здесь мы остановимся лишь на кратком изложении истории открытия сПОР и генетических аспектов его исследований.

3.1. Генетический контроль фотопревращения ПХЛД

Впервые о выделении из этиопластов пигмент-белкового комплекса, в отсутствии которого не происходит восстановление ПХЛД, сообщили А. А. Красновский (1952), а также Смит с Бенитезом (Smith, Benitez, 1953), которые назвали его «протохлорофиллид-голохромом». Установление корреляции между уменьшением содержания ПХЛД и увеличением содержания ХЛД при освещении этиолированных листьев в условиях низких температур (Smith, Trench, 1958) позволило высказать предположение, что голохромный белок является фо-

тозависимой редуктазой. Эта гипотеза получила подтверждение в конце 70-х годов, когда сПОР молекулярной массой 36 kDa была выделена из проростков ячменя (Apel et al., 1980), а затем других растений. Ген *Por* ячменя, который кодирует сПОР, был клонирован первым среди генов, контролирующих биосинтез ХЛ у растений (Schulz et al., 1989). Авторам удалось выделить сПОР в количестве, достаточном для создания антител, которые были использованы для поисков гена этого фермента в библиотеке кДНК. В дальнейшем этот ген был идентифицирован у разных растений: пшеницы, овса, гороха, арабидопсиса и сосны, а также у хламидомонады и цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC6803 (Reinbothe, Reinbothe, 1996).

Мутанты *C. reinhardtii* по генам, кодирующим сПОР, были получены в результате мутагенеза клеток термочувствительного желтого мутанта y-1-4 (фенотип: желтый в темноте, зеленый на свету), как штаммы, неспособные зеленеть на свету при непермиссивной температуре. Генетический анализ показал, что такой фенотип обусловлен мутациями в ядерном локусе *pc-1*, картированном в I группе сцепления на 1 сМ дистальнее локуса *y-5* (Ford et al., 1981; 1983). Оказалось, что *pc-1* — это мутация, приводящая к сдвигу рамки считывания в гене *Por1*, кодирующем сПОР. Клетки мутантов генотипа *pc-1* были способны синтезировать 52 и 36 % хлорофилла дикого типа в темноте и на свету, соответственно. Это означало, что в отсутствии сПОР механизм темнового восстановления ПХЛД может функционировать и на свету (Li, Timko, 1996).

Несколько генов, кодирующих изоформы белка ПОР (PORA, PORB, PORC) имеются у *A. thaliana* (Oosawa et al., 2000), ячменя (Holtorf et al., 1995), и некоторых видов голосеменных растений (Skinner, 1999), тогда как в геноме цианобактерий и хламидомонады (Li, Timko, 1996) он мономорфен. У всех изученных растений гены *POR* по-разному регулируются светом. Он ингибирует экспрессию *PORA* — ген активно транскрибируется только в этиолированных проростках, и активирует экспрессию генов *PORB* и *PORC* при переносе растений из темноты на свет (Frick et al., 2003). Роль различных изоформ сПОР и кодирующих их генов в превращении ПХЛД в ХЛД, в биогенезе тилакоидов, в формировании комплекса сПОР, защите от фотоокисления и в процессе зеленения в настоящее время усиленно изучается (Литвин, Беляева, 2007; Беляева, 2009: Masuda, Takamiya, 2005).

3.2 Молекулярная структура сПОР

Продукт гена ячменя *Por1* — это белок из 388 аминокислот с транзитным пептидом размером 74 а. о. (Schulz et al., 1989). Гены, кодирующие сПОР, изолированы из организмов, относящихся к разным таксономическим группам, от цианобактерий до высших растений (Schoefs, Franck, 2003). Первичная структура белка сПОР характеризуется высоким содержанием аминокислот с основными свойствами и большим количеством гидрофобных аминокислотных остатков. Все известные к настоящему времени сПОР содержат 4 консервативных остатка цистеина (у гороха в позициях: 119, 170, 280 и 307), один из которых может быть вовлечен в связывание с ПХЛД. Вторичная структура сПОР установлена на основе спектров кругового дихроизма мономерного белка — его молекула состоит из 8–9 α-спиралей (33 %), 7 β-цепей (19 %), 20 % поворотов и 28 % случайных петель (Birve et al., 1996). Показано, что молекула сПОР присоединяется к мембране двухсторонними сегментами, содержащими остатки триптофана, локализованного около С-конца, или гидрфобными петлями. Сравнение структуры сПОР со структурой других НАДФ-зависимых белков позволило отнести этот фермент к семейству алкогольдегидрогеназ (Beale, 1999).

3.3 Локализация и функционирование сПОР

In vitro очищеный белок, кодируемый геном *POR1*, — мономер молекулярной массой 35–38 kDa (Oliver, Griffith, 1980; Apel et al., 1980). В условиях *in vivo* сПОР ассоциирован с мембранами пластид. Образование комплекса этого фермента с НАДФН и ПХЛД является необходимым условием стабильной ассоциации с тилакоидами. Полагают, что в этом комплексе ПХЛД служит фоторецептором (Griffiths, 1991), а НАДФН выступает в качестве донора электронов, которые передаются ПХЛД (Griffiths et al., 1996). Если комплекс не образуется, то сПОР разрушается протеазами, содержащимися строме (Beale, 1999).

Транскрипты ядерных генов, кодирующих сПОР, обычно накапливаются в цитозоле около поверхности пластид (Marrison et al., 1996), где и происходит их трансляция на 80S рибосомах (Batschauer et al., 1982). Молекулы пре-сПОР, содержащие хлоропластные транзитные пептиды, транспортируются в хлоропласты. В это время они взаимодействуют с белками PTC (сокр. англ. protochlorophyllide-dependent translocation complex), которые являются компонентами Toc/Tic-транслоконов, или комплексов, которые расположены по обе стороны оболочки хлоропласта и обеспечивают импорт белков из цитоплазмы (Reinbothe et al., 2004; 2005). Существование ПХЛД-зависимых транслоконов (Schemenewitz et al., 2007) подтвердило обсуждаемую с 1995 г. гипотезу об участии ПХЛД в регуляции транспорта белков в хлоропласт (Reinbothe et al., 1995). Установлено, что для ассоциации сПОР с тилакоидами в качестве кофактора необходим НАДФ (Dahlin et al., 1999). Возможная роль в этом процессе вторичной структуры сПОР активно обсуждается (Aronsson et al., 2003).

Если этиолированные проростки покрытосеменных растений (ячменя, традесканции и др.) осветить в тече-

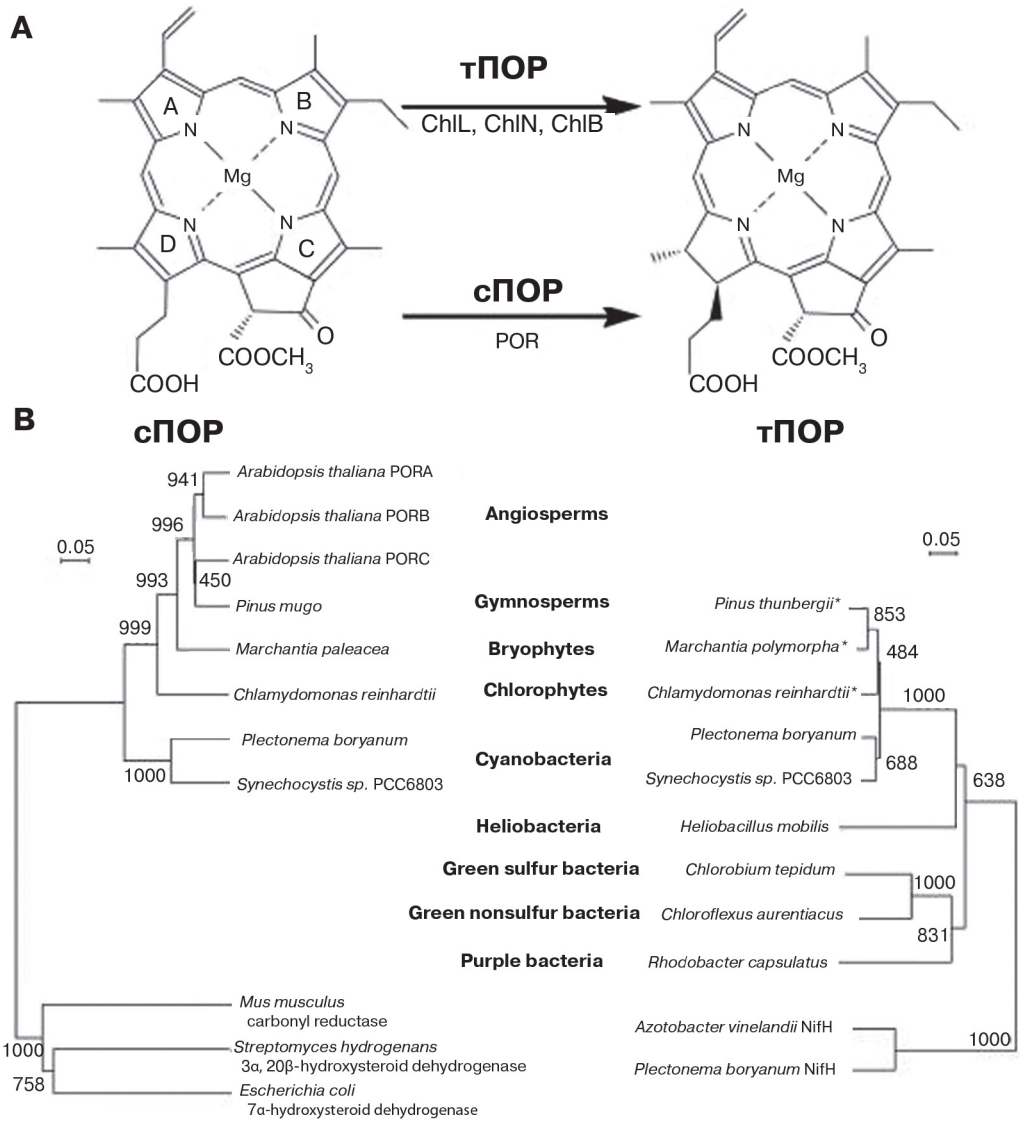

Рис. 4. Филогения тПОР и сПОР.
Представлена молекулярная филогения (B) ферментов, осуществляющих превращение ПХЛД в ХЛД (A) (по: Yamazaki et al., 2006)

ние нескольких часов, а затем снова поместить их в темноту, они продолжают синтезировать ХЛ на уровне 20–30 % нормы (Popov, Dilova, 1969; Adamson et al., 1985). Отвечая на вопрос, каким образом осуществляется этот синтез в отсутствие тПОР, Раскин и Шварц (Raskin, Schwartz, 2003) установили, что ингибирование аскорбатпероксидазы салициловой кислотой ведет к прекращению темнового синтеза ХЛ у ячменя. Они предположили, что в темноте превращение ПХЛД в ХЛД может осуществлять и сПОР, которая использует электроны, полученные от аскорбата. Метод низкотемпературной спектроскопии позволил показать, что каталитический механизм сПОР включает в себя две промежуточные стадии, не требующие света, которые могут быть связаны с изменением положения или конформации молекулы фермента (Heyes et al., 2003).

3.4 . Эволюционное происхождение ПОР

Первоначально полагали, что сПОР появилась в процессе эволюции только у прокрытосеменных растений, однако, в 90-х годах XX века выяснилось, что геномы цианобактерий и водорослей также содержат ген, кодирующий этот фермент. У цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC6803 он был обнаружен как ген, который при трансформации комплементирует мутацию, аналогичную мутации, блокирующей тПОР *R. cupsulatus* (Suzuki, Bauer, 1995). Аминокислотная последовательность белка, кодируемого этим геном, оказалась сходной с аминокислотной последовательностью сПОР высших растений. Филогенетический анализ субъединиц сПОР и близких к ней ферментов семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз показал, что эволюционная история генов сПОР нача-

лась с цианобактерий (рис. 4), а эукариоты получили их в результате эндосимбиотического горизонтального переноса, случившегося до момента дивергенции фототрофных ядерных организмов (Yang, Chen, 2004; Fong, Archibald, 2008). Молекулярная филогения тПОР однозначно свидетельствует о происхождении кодирующих его генов от нитрогеназ бактерий (Xiong et al., 2000; Yamazaki et al., 2006).

4. АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ У ОРГАНИЗМОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ХЛОРОФИЛЛ В ТЕМНОТЕ И НА СВЕТУ

Первичная оценка эффективности темнового и светового биосинтеза ХЛ может быть дана путем измерения уровня этих пигментов в клетках дикого типа и бесхлорофильных мутантов, выращенных в темноте и на свету. При изучении влияния освещения на накопление ХЛ у нескольких видов сосны было установлено, что в темноте 14–22-х дневные проростки *Pinus taeda* (Griffiths, 1991), *P. thunbergii* (Shinohara et al., 1992) и *P. sylvestris* (Drumm-Herrel, Mohr, 1994) синтезируют 20–25 % светового уровня ХЛ.

У мутантов цианобактерий с неактивным комплексом тПОР на свету полностью восстанавливается уровень содержания ХЛ за счет активности сПОР. Скорость накопления ХЛ при фототрофном росте так же, как и в хемогетеротрофных условиях в темноте, у мутантов *P. boryanum* с дефектными генами *chlL, chlM* и *chlN* были сходны с таковыми у штаммов дикого типа (Fujita et al., 1998). Аналогичные результаты были получены на мутантах *Synechocystis sp.* по генам *chlL* и *chlN* (Wu, Vermas, 1995); и это свидетельствует о том, что светонезависимый биосинтез ХЛ не является необходимым для цианобактерий на свету.

Многие yellow-мутанты хламидомонады (как ядерные, так и хлоропластные) при росте на свету накапливают меньше ХЛ, чем штаммы дикого типа. В зависимости от генотипа его содержания снижается до 35 % (мутант y-5) до 78–98 % (мутант y-1a) уровня дикого типа (Ford, Wang, 1980; Ford et al., 1981). Клетки мутанта pc-1 *C. reinhardtii*, у которого не функционирует сПОР (Ford et al., 1981; 1983; Li, Timko, 1996) в темноте содержат наполовину меньше ХЛ, чем штаммы дикого типа, выращенные в сходных условиях. Возможно, что отсутствие светозависимого фермента каким-то образом снижает уровень темнового синтеза ХЛ, оказывая влияние либо на активность тПОР, либо на содержание ПХЛД. На свету этот мутант накапливает 36 % ХЛ дикого типа. По-видимому, такой уровень пигмента обеспечивается активностью тПОР. Способность мутанта pc-1 накапливать на свету втрое больше ХЛ, чем в темноте, позволяет предпожить, что светонезависимая редукция ПХЛД может позитивно регулироваться светом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Еще в начале 90-х годов XX века считали, что темновой биосинтез ХЛ — результат биохимических модификаций сПОР. Сейчас очевидно, что темновое и светозависимое восстановление ПХЛД контролируются разными генами, кодирующими два разных по стуктуре и происхождению ферментных комплекса. Методами классической и молекулярной генетики и геномики при изучении фотосинтезирующих бактерий, зеленых водорослей и высших растений были найдены три гена, контролирующие светонезависимое превращение ПХЛД в ХЛД — *chlL, chlB* и *chlN* (*bhlL, bhlB* и *bchN* у бактерий, синтезирующих БХЛ). Эти гены кодируют субъединицы ферментного комплекса тПОР, сходные по структуре с субъединицами нитрогеназы NifHDK (Muraki et al., 2010). Они обнаружены только у организмов, синтезирующих ХЛ в темноте, и у представителей эукариот локализованы в геномах пластид (Armstrong, 1998; Nomata et al., 2005).

Подобно ДНК-фотолазе (Begly, 1994), сПОР — это «фотоэнзим», или фермент, которому для проявления каталитической активности необходим свет. Она относится к семейству дегидрогеназ/редуктаз короткоцепочечных спиртов и так же, как тПОР, имеет прокариотное происхождение.

Основываясь на филогенетическом анализе и характере распределения тПОР и сПОР среди фототрофных организмов, мы можем предположить, что присущая аноксигенным бактериям тПОР — более архаичная ферментная система, имеющая общее происхождение с нитрогеназой. В процессе эволюции сПОР, по-видимому, появилась вместе с оксигенной фототрофией в ответ на увеличение содержания O_2 в атмосфере, что компенсировало потерю активности чувствительной к кислороду тПОР (Schoefs, Franck, 2003; Fujita et al., 2006).

Какими причинами было обусловлено появление светозависимого аппарата биосинтеза ХЛ? Какова цена утраты комплекса тПОР покрытосеменными растениями? Исчерпывающие ответы на эти вопросы еще не получены. Биоинтез БХЛ у современных анаэробных бактерий ингибируется светом и кислородом (Shiba, Shimada, 1997). Такое ингибирование можно рассматривать как механизм предотвращения потенциальной опасности фотоокисления (Шалыго, 2004). Молекулы порфиринов (к которым относятся БХЛ, ХЛ и их биосинтетические предшественники) — сильные фотосенсибилизаторы, на свету вызывающие образование синглетного кислорода. В аэробных условиях ингибирование тПОР светом и кислородом может снижать эфективность фотосинтеза и приводить к накоплению ПХЛД (Fujita, Bauer, 2000). Появление сПОР предотвращало этот процесс и обеспечивало эффективный оксигенный фотосинтез.

Установлено, что организмы, способные к светозависимому и светонезависимому синтезу ХЛ (БХЛ), вы-

бирают пути восстановления ПХЛД в зависимости от интенсивности освещения и содержания кислорода. Цианобактерия *P. borianum* на слабом свету (интенсивностью менее 10–25 мкмоль квантов $м^{-2} \times с^{-1}$) образует ХЛ только с помощью тПОР; при освещенности свыше 130 мкмоль квантов $м^{-2} \times с^{-1}$ весь ХЛ синтезируется исключительно с помощью сПОР, а при средней интенсивности света (25–130 мкмоль квантов $м^{-2} \times с^{-11}$) функционируют оба фермента, и большая часть ХЛ образовывалась по светозависимому пути (Fujita et al., 1998). Мутант, лишенный сПОР, терял способность расти в аэробных условиях и при высокой интенсивности света. Его перенесение в анаэробные условия приводило к возобновлению роста и биосинтеза ХЛ (Yamazaki et al., 2006). Все эти данные свидетельствуют о том, что тПОР и сПОР компенсируют функции друг друга в зависимости от состояния окружающей среды, позволяя организмам выживать при изменении освещенности и содержания кислорода.

Для аэробных фотосинтетиков сПОР имеет несколько очевидных преимуществ перед тПОР:

- фермент нечувстсвителен к кислороду;
- как фотоэнзим, он лимитирует накопление фотосенсибилизатора ПХЛД, предотвращая процессы фотодеструкции;
- скорость восстановления ПХЛД с помощью сПОР значительно выше, чем в случае тПОР, что обеспечивает высокую продуктивность биосинтеза ХЛ.

По-видимому, эти преимущества стали причиной перехода покрытосеменных растений к светозависимому синтезу ХЛ в условиях оксигенного фотосинтеза, что сопровождалось потерей генов, кодирующих тПОР. Для адаптации к разным условиям освещения некоторые растения, например арабидопсис, взамен утраченной тПОР обзавелись несколькими гомологичными генами сПОР (*PORA, PORB* и *PORC*), экспрессия которых по-разному зависит от света и наличия НАДФН (Kim, Apel, 2004).

Следует отметить, что свет и кислород оказывают критическое влияние на жизнь фотосинтезирующих организмов и, по-видимому, являются основными факторами эволюции фототрофов, которая шла в направлении адаптации к этим изменяющимся параметрам внешней среды. Более архаичный темновой биосинтез ХЛ сформировался в анаэробных условиях, а затем эволюция ХЛ-синтезирующих организмов шла по пути адаптпции к увеличению интенсивности света (при переходе из воды на сушу) и содержания кислорода.

В то время как сПОР изучена довольно подробно (Беляева, 2009), современные знания о темновом биосинтезе ХЛ, так же, как и сведения о механизмах адаптации растительной клетки к свету крайне немногочисленны. В культурах штаммов хламидомонады, растущих на свету, мутации yellow спонтанно возникают с высокой частотой (10^{-3}–10^{-4}). По-видимому, в фототрофных условиях потеря тПОР дает селективное преимущество, и наличие ядерных генов *yellow*, мутации по которым блокируют темновое восстановление ПХЛД, необходимо для регуляции активности тПОР. Вероятно, продукты этих генов участвуют в регуляции экспрессии хлоропластных генов, ответственных за биосинтез ХЛ на уровне образования и функционирования кодируемых ими белков (Cahoon, Timko, 2000). Биологическая природа и механизмы действия этих регуляторов крайне интересны, но пока неизвестны.

Темновой биосинтез ХЛ обеспечивается не только генами, контролирующими накопление и регуляцию тПОР. Помимо мутантов yellow, у хламидомонады описан иной тип мутантов по темновому биосинтезу ХЛ, которые накапливают в темноте протопорфирин IX — более ранний, чем ПХЛД, предшественник ХЛ и способные зеленеть в темноте (Wang et al., 1974; Чекунова, Квитко, 1986; Шалыго и др., 1990). Комплексное генетико-биохимическое исследование этих мутантов (brc-1 и lts3) позволило найти специфичный для эукариот GATA1-транскрипционный фактор LTS3, необходимый для экспрессии в темноте генов, кодирующих фермент магний-хелатазу — более ранний, чем ПОР в цепи биосинтеза ХЛ (Чекунова, Савельева, 2010). Обнаружение этого фактора свидетельствует, что независимый от света биосинтез тетрапирролов в фотосинтезирующей клетке обеспечивается и путем регуляции на уровне транскрипции генов, кодирующих магний-хелатазу.

Наши представления о генетике более архаичного темнового синтеза ХЛ еще только формируются. Исследования в этой области позволят выяснить роль геномов ядра и хлоропластов в регуляции этого процесса, а также в обеспечении адаптации фототрофов к важнейшему для них фактору внешней среды — свету.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ: 09-04-01646а

Литература

1. *Александрова Н. Н., Крэла Л. П., Тугаринов В. В.,* 1979. Генетическая детерминация признаков хлоропласта у хламидомонады. Сообщ. I. Создание множественно-маркированных линий // Исследования по генетике. Вып. 8. С. 139–149.
2. *Беляева О. Б.,* 2009. Светозависимый биосинтез хлорофилла // Москва: Изд. «Бином. Лаборатория знаний»/ 232 с.
3. *Беляева О. Б., Литвин Ф. Ф.,* 2007. Фотоактивные пигмент-ферментные комплексы предшественника хлорофилла в листьях растений // Усп. биол. химии. Т. 47. С. 189–232.
4. *Красновский А. А., Кособуцкая Л. М.,* 1952. Спектральные исследования состояния хлорофилла при его образовании в растении и в коллоидных растворах вещества этиолированных листьев // ДАН СССР. Т. 85. С. 177–180.
5. *Пиневич А. В., Аверина С. Г.,* 2002. Оксигенная фототрофия // СПб: Изд. СПбГУ. 236 с.

6. *Чекунова Е. М., Квитко К. В.,* 1986. Генетическое изучение мутантов хламидомонады, накапливающих протопорфирин IX // Исследования по генетике. № 10. С. 104–112.
7. *Чекунова Е. М., Савельева Н. В.,* 2010. Ген *LTS3* контролирует светонезависимый биосинтез хлорофилла у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Экологическая генетика. № 2. С. 35–44.
8. *Шалыго Н. В.,* 2004. Биосинтез хлорофилла и фотодинамические процессы в растениях // Минск: ИООО «Право и экономика». 156 с.
9. *Шалыго Н. В., Чекунова Е. М., Чунаев А. С., Аверина Н. Г.,* 1990. Анализ состава порфиринов в мутантах *Chlamydomonas reinhardtii* // Изв. АН БССР. Сер. Биол. наук. № 4. С. 53–57.
10. *Шестаков С. В.* Молекулярная генетика фотосинтеза // СОЖ. 1998. № 9. С. 22–27.
11. *Adamson H., Griffiths T., Parker N., Sutherland M.,* 1985. Light independent accumulation of chlorophyll a and b and protochlorophyllide in green barley *(Hordeum vulgare)* // Plant Physiol. Vol. 64. P. 345–352.
12. *Apel K., Santel H. J., Redlinger T. E., Falk H.,* 1980. The protochlorophyllide holochrome of barley *(Hordeum vulgare)*. Isolation and characterization of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase // Eur. J. Biochem. Vol. 111. P. 251–258.
13. *Armstrong G. A.,* 1998. Greening in the dark: light independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms // J. Photochem. Photobiol. Vol. 43. P. 87–100.
14. *Aronsson H., Sundqvist Ch., Dahlin C.,* 2003. POR hits the road: import and assembly of a plastid protein // Plant Mol. Biol. Vol. 51. P. 1–7.
15. *Batschauer A., Santel H. J., Apel K.,* 1982. The presence and synthesis of the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in barley leaves with a high-temperature-induced deficiency of plastid ribosomes // Planta. Vol. 154. P. 459–464.
16. *Beale S. I.,* 1999. Enzymes of chlorophyll biosynthesis // Photosynth. Res. Vol. 60. P. 43–73.
17. *Begley T. P.,* 1994. Photoenzymes: a novel class of biological catalysts // Acc. Chem. Res. Vol. 27. P. 394–401.
18. *Birve S. J., Selstam E, Johansson L. B. A.,* 1996. Secondary structure of NADH: protochlorophyllide oxidoreductase examined by circular dichroism and prediction methods // Biochemistry. Vol. 317. P. 549–555.
19. *Bogorad L.,* 1976. Chlorophyll biosynthesis // In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments / ed. Goodwin T. W. New York: Acad. Press. P. 64–148.
20. *Burke D. H., Alberti M., Hearst J. E.,* 1993. bchFNBH bacteriochlorophyll synthesis genes of Rhodobacter capsulatus and identification of the third subunit of light-independent protochlorophyllide reductase in bacteria and plants // J. Bacteriol. Vol. 175. P. 2414–2422.
21. *Cahoon A. B., Timko M. P.,* 2000. Yellow-in-the-dark mutants of Chlamydomonas lack the CHLL subunit of light-independent protochlorophyllide reductase // Plant Cell. Vol. 12. P. 559–568.
22. *Choquet Y., Rahire M., Girard-Bascou J., Erickson J., Rochaix J.-D.,* 1992. A chloroplast gene is required for light-independent accumulation of chlorophyll in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. EMBO. Vol. 11. No. 5. P. 1697-1704.
23. Choudhary M., Kaplan S., 2000. DNA sequence analysis of the photosynthesis region of *Rhodobacter sphaeroides* 2. 4. 1 // Nucl. Acids Res. Vol. 28. P. 862–867.
24. *Dahlin C., Aronsson H., Wilks H. M., Lebedev N., Sundqvist C., M. P. Timko M. P.,* 1999. The role of protein surface charge in catalytic activity and chloroplast membrane association of the pea NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) as revealed by alanine mutagenesis // Plant Mol. Biol. Vol. 39. P. 309–323.
25. *Demko V., Pavlovic A., Valkova D., Slovakova L., Grimm B., Hudak J.,* 2009. A novel insight into the regulation of light-independent chlorophyll biosynthesis in Larix decidua and Picea abies seedlings // Planta. Vol. 230. P. 165–176.
26. *Drumm-Herrel H., Mohr H.,* 1994. Regulation by light of chlorophyll synthesis in the cotyledons of Scots pine (Pinus sylvestris) seedlings // Physiol. Plant. Vol. 91. P. 300–306.
27. *Fong A., Archibald J. M.,* 2008. Evolutionary dynamics of light-independent protochlorophyllide oxidoreductase genes in the secondary plastids of cryptophyte algae // Eukar. Cell. Vol. 7. P. 550–553.
28. *Ford C., Mitchell S., Wang W. Y.,* 1981. Protochlorophyllide photoconversion mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. Vol. 184. P. 460–464.
29. *Ford C., Mitchell S., Wang W. -Y.,* 1983. Characterization of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase in the y-7 and pc-1 y-7 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. Vol. 192. P. 290–292.
30. *Ford C., Wang W-Y.,* 1980a. Three new yellow loci in Chlamydomonas reinhardtii // Mol. Gen. Genet. Vol. 179. P. 259–263.
31. *Ford C., Wang W-Y.,* 1980b. Temperature sensitive yellow mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. Vol. 180. P. 5–10.
32. *Frick G., Su Q., Apel K., Armstrong G. A.,* 2003. An *Arabidopsis* porB porC double mutant lacking light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested // Plant J. Vol. 35 (2). P. 141–53.
33. *Fujita, Y., Bauer C. E.,* 2000. Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified BchL and BchN-BchB subunits. In vitro confirmation of nitrogen-like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme // J. Biol. Chem. Vol. 275. P. 23583–23588.
34. *Fujita, Y., Matsumoto H., Takahashi Y., Matsubara H.,* 1993. Identification of a nifDK-like gene (ORF467) involved in the biosynthesis of chlorophyll in the cyanobacterium Plectonema boryanum // Plant Cell Physiol. Vol. 34. P. 305–314.
35. *Fujita, Y., Takagi H., Hase T.,* 1996. Identification of a chlB gene product essential for light-independent chlorophyll biosynthesis in the cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell Physiol. Vol. 37. P. 313–323.

36. *Fujita Y., Takagi H., Hase T.,* 1998. Cloning of the gene encoding a protochlorophyllide reductase: the physiological significance of the co-existence of light-dependent and -independent protochlorophyllide reduction systems in the cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell Physiol. Vol. 39. P. 177–185.
37. *Fujita, Y., Takahashi Y., Chuganji M., Matsubara H.,* 1992. The nifH-like (frxC) gene is involved in the biosynthesis of chlorophyll in the filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell Physiol. Vol. 33. P. 81–92.
38. *Fujita Y., Takahashi, Y., Koschi., Ozeki H., Ohyama K., Matsubara H.,* 1989. Identification of a novel nifH-like (frxC) protein in chloroplasts of liverwort *Marchantia polymorpha* // Plant Mol. Biol. Vol. 13. P. 551–561.
39. *Fujita, Y., Takahashi Y., Koschi T., Ozeki H., Ohyama K., Matsubara H.,* 1991. Cloning, nucleotide sequences and differential expression of the nifH and nifH-like (frxC) genes from the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell. Physiol. Vol. 32. P. 1093–1106.
40. *Griffiths, W. T.,* 1991. Protochlorophyllide reduction // Chlorophylls / Ed. Scheer H. Boca Raton — CRC Press. P. 433–450.
41. *Griffiths W. T., McHugh T., Blankenship R. E.,* 1996. The light intensity dependence of protochlorophyllide photoconversion and its significance to the catalytic mechanism of protochlorophyllide reductase // FEBS Lett. Vol. 398. P. 235–238.
42. *Hearst J. E., Alberti R. F., Doolittle R. F.,* 1985. A putative nitrogenase reductase gene found in the nucleotide sequences from photosynthetic gene cluster of *R. capsulata* // Cell. Vol. 40. P. 219–220.
43. *Heyes D. J., Ruban A. V., Hunter C. N.,* 2003. Protophlorophyllide oxidoreductase: "dark" reactions of a light-driven enzyme // Biochemistry. Vol. 42. P. 523-538.
44. *Holtorf H., Reinbothe S., Reinbothe R., Bereza B., Apel K.,* 1995. Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley *(Hordeum vulgare L.)* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 92. P. 3254–3258.
45. *Huang C., Liu X-Q.,* 1992. Nucleotide sequence of the frxC, petB and trnL genes in the chloroplast genome of *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Mol. Biol. Vol. 18. P. 985–988.
46. *Kim C., Apel K.,* 2004. Substrate-dependent and organ-specific chloroplast protein import in planta // Plant Cell. Vol. 16. P. 88–98.
47. *Laudi G., Manzini M. L.,* 1975. Chlorophyll content and plastid ultrastructure in leaflets of *Metasequoia glyptostroboides* // Protoplasma. Vol. 84. P. 185–190.
48. *Lebedev N., Timko M.,* 1998. Protochlorophyllide photoreduction // Photosynth. Res. Vol. 58. P. 5–23.
49. *Li J., Goldschmidt-Clermont M., Timko M. P.,* 1993. Chloroplast encoded chlB is required for light-independent protochlorophyllide reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell. Vol. 5. P. 1817–1829.
50. *Li J., Timko M. P.,* 1996. The pc-1 phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* results from a deletion mutation in the nuclear gene for NADPH protochlorophyllide oxidoreductase // Plant. Mol. Biol. Vol. 30. P. 15–37.
51. *Lindholm J., Gustafsson P.,* 1991. Homologues of the green algal gidA and the liverwort frxC gene are present on the chloroplast genomes of conifers // Plant Mol. Biol. Vol. 17. P. 787–798.
52. *McCoy S. R., Kuehl J. V., Boore J. L Raubeson L. A.,* 2008. The complete plastid genome sequence of *Welwitschia mirabilis*: an unusually compact plastome with accelerated divergence rates // Evol Biol. Vol. 8. P. 130.
53. *Mariani P., De Carli M. E., Rascio N., Baldan B., Casadoro G., Gennari G., Bodner M., Larcher W.,* 1990. Synthesis of chlorophyll and photobiosynthetic competence in etiolated and greening seedlings of Larix decidua as compared with *Picea abies* // J. Plant Physiol. Vol. 137. P. 5–14.
54. *Marrison J. L., Schunmann P. H. D., Oughan H. J., Leech R. M.,* 1996. Subcellular visualization of gene transcripts encoding key proteins of the chlorophyll accumulation process in developing chloroplasts // Plant Physiol. Vol. 110, P. 1089–1096.
55. *Masuda T., Takamiya K-I.,* 2005. Novel insights into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms // Photosynth. Res. Vol. 81. P. 1–29.
56. *Muraki N., Nomata J., Ebata K., Mizoguchi T., Shiba T., Tamiaki H., Kurisu G., FujitaY.,* 2010. X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase // Nature Vol. 465. P. 110–114.
57. *Nomata J., Mizoguchi T., Tamiaki H., Fujita Y.,* 2006. A second nitrogenase-like enzyme for bacteriochlorophyll biosynthesis: reconstitution of chlorophyllide a reductase with purified X-protein (BchX) and YZ-protein (BchY-BchZ) from *Rhodobacter capsulatus* // J. Biol. Chem. Vol. 281. P. 15021–15028.
58. *Nomata J., Swem L. R., Bauer C. E., Fujita Y.,* 2005. Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus* // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1708. P. 229–235.
59. *Ogura Y., Takemura M., Oda K., Yamatu K., Ohta E., Fukazawa H., Ohyama K.,* 1992. Cloning and nucleotide sequence of a frxC-ORF469 gene cluster of Synechocystis PCC6803 conservation with liverwort chloroplast frxC-ORF465 and nif operon // Biosci. Biotech. Biochem. Vol. 56. P. 788–793.
60. *Ohyama K., Fukazawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Sano S., Umesono K., Shiki Y., et al.,* 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* // Nature. Vol. 322. P. 572–574.
61. *Oliver R. P., Griffiths W. T.,* 1980. Identification of the polypeptides of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase // Biochem. J. Vol. 191. P. 277–280.

62. *Oosawa N., Masuda T., Awai K., Fusada N., Shimada H., Ohta H., Takamiya K.,* 2000. Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana* // FEBS Lett. Vol. 474. P. 133–136.
63. *Ou K., Adamson H.,* 1995. Chlorophyll accumulation in cotyledons, hypocotyls and primary needles of *Pinus pinea* seedlings in light and dark // Physiol. Plant. Vol. 93. P. 719–724.
64. *Popov K., Dilova S.,* 1969. On the dark sinthesis and stabilization of chlorophyll // In: Progress in Photosynthesis Research / ed. Metzner H. Inst. Union Biol. Sci.,Tubingen Vol. 2. P. 606–609.
65. *Raskin V. I., Schwartz A.,* 2003. Experimental approach to elucidating the mechanism of light-independent chlorophyll biosynthesis in green barley // Plant Physiol. Vol. 133. P. 25–28.
66. *Raymond J., Siefert J. L., Staples Ch. R., Blankenship R. E.,* 2004. The natural history of nitrogen fixation // Mol. Biol. Evol. Vol. 21. P. 541–554.
67. *Reinbothe S., Pollmann S., Springer A., James R. J., Tichtinsky G., Reinbothe C.,* 2005. A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A // Planta. Vol. 42. P. 1–12.
68. *Reinbothe S., Quigley F., Gray J., Schemenewitz A., Reinbothe C.,* 2004. Identification of plastid envelope proteins required for import of protochlorophyllide oxidoreductase A into the chloroplast of barley // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 97. P. 9795–9800.
69. *Reinbothe S., Reinbothe C.,* 1996. The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis // Eur. J. Biochem. Vol. 237. P. 323–343.
70. *Reinbothe S., Runge S., Reinbothe C., van Cleve B., Apel K.,* 1995. Substrate-dependent transport of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase into isolated plastids // Plant Cell. Vol. 7. P. 161–172.
71. *Richard M., Tremblay C., Bellemare G.,* 1994. Chloroplastic genomes of *Ginkgo biloba* and *Chlamydomonas moewusii* contain a chlB gene encoding one subunit of a light-independent protochlorophyllide reductase // Curr. Genet. Vol. 26. P. 159–156.
72. *Roitgrund C., Mets L. J.,* 1990. Localization of two novel chloroplast genome functions: trans-splicing of RNA and protochlorophyllide reduction // Curr. Genet. Vol. 17. P. 147–153.
73. *Rubio L. M., Ludden P. W.,* 2005. Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle // J. Bacteriol. Vol. 187. P. 405–414.
74. *Sager R.,* 1955. Inheritance in the green alga Chlamydomonas reinhardtii // Genetics. Vol. 40. P. 476–489.
75. *Schemenewitz A., Pollmann S., Reinbothe C., Reinbothe S.,* 2007. A substrate-independent, 14:3:3 protein-mediated plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 104. P. 8538–8543.
76. *Schoefs B., Franck F.,* 2003. Protochlorophyllide reduction: mechanisms and evolution // Photochem. Photobiol. Vol. 78. P. 543–557.
77. *Schulz R., Steinmuller K., Klaas M., Forreiter C., Rasmussen S., Hiller C., Apel K.,* 1989. Nucleotide sequence of cDNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (POR) of barley *(Hordeum vulgare L.)* and its expression in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet. Vol. 217. P. 355–361.
78. *Shiba, T. and Shimada K.,* 1997. Photosynthetic aspects of aerobic photosynthetic bacteria // Handbook of Photosynthesis / Ed. M. Pessarakli, Marcel Dekker, New York. P. 505–512.
79. *Skinner J. S., Timko M. P.,* 1999. Differential expression of genes encoding the light-dependent and light-independent enzymes for protochlorophyllide reduction during development in lobolly pine // Plant Mol. Biol. Vol. 39. P. 577–592.
80. *Shinohara K., Murakami A., Fujita Y.,* 1992. Biochemical characteristics of thylakoid membranes in chloroplasts of dark-grown pine cotyledons // Plant Physiol. Vol. 98. P. 39–43.
81. *Smith J. H. C., Benitez A.,* 1953. The protochlorophyll-chlorophyll transformation: the nature of protochlorophyll in leaves // Carnegie Inst. Year Book. Washington, DC. 52, P. 151–153.
82. *Smith, J. H. C., French C. S.,* 1958. Quantum yield for the protochlorophyll conversion // Carnegie Inst. Yeare Book. Washington. Vol. 57. P. 290–293.
83. *Suzuki, J. Y., Bauer C. E.,* 1992. Light-independent chlorophyll biosynthesis: involvement of the chloroplast gene chlL (frxC) // Plant Cell. Vol. 4. P. 929–940.
84. *Suzuki, J. Y, Bauer C. E.,* 1995. A procaryotic origin for light-dependent chlorophyll biosynthesis of plants // Proc. Natl. Acad. Scie. USA. Vol. 92. P. 3749–3753.
85. *Takio S., Satoh T.,* 1995. Expression patterns of chloroplast genes involved in light-independent chlorophyll synthesis in liverwort cells // In: Photosynthesis:from Light to Biosphere / ed: Mathi P. Dordrecht. Kluwer Acad. Publ. Vol. III. P. 941–944.
86. *Yamamoto H., Kurumiya S,, Ohashi., Fujita Y.,* 2009. Oxygen sensitivity of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana* // Plant Cell Physiol. Vol. 50. P. 1663–1673.
87. *Yamazaki S, Nomata J, Fujita Y.,* 2006. Differential operation of dual protochlorophyllide reductases for chlorophyll biosynthesis in response to environmental oxygen levels in the cyanobacterium Leptolyngbya boryana // Plant Physiol. Vol. 142. P. 911–922.
88. *Yang J., Chen Q.,* 2004. Origin and evolution of the light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR) genes // Plant Biol. Vol. 6. P. 537–544.
89. *Xiong J., Fischer W. M., Inoue K., Nakahara M., Bauer C. E.,* 2000. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis // Science. Vol. 289. P. 1724–1730.

90. *Wang W. -Y., Wang W. L., Boynton J. E., Gillham N. E.* 1974. Genetic control of chlorophyll biosynthesis in Chlamydomonas. Analysis of mutants at two loci mediating the conversion of protoporthyrin-IX to magnesium-protoporphyrin // J. Cell Biol. Vol. 63. P. 806–823.
91. *von Wettstein D., Gouth S., Kannangara C. G.,* 1995. Chlorophyll biosynthesis // Plant Cell. Vol. 7. P. 1039–1057.
92. *Wu Q., Vermaas W. F.,* 1995. Light-dependent chlorophyll a biosynthesis upon chlL deletion in wild type and Photosystem I-less strains of the cyanobacterium Synechocystis sp PCC 6803 // Plant Mol. Biol. Vol. 29. P. 933–945.
93. *Zsebo K. M., Hearst J. E.,* 1984. Genetic physical mapping of a photosynthetic gene cluster from *R. capsulate* // Cell. Vol. 37. P. 937–947.

THE GENETICS OF CHLOROPHYLL BIOSYNTHESIS: LIGHT-INDEPENDENT AND LIGHT-DEPENDENT PATHWAYS

Chekunova E. M.

❀ **SUMMARY: The review summarizes contemporary genetical, molecular biological and biochemical data on the two protochlorophyllide oxidoreductases (POR), enzymes responsible of light-dependent (LPOR) and dark-operative (DPOR) protochlorophyllide reduction. Evolutionary aspects of origin and functioning of these enzymes are also discussed. The main focus of this review will be the genetics of archaic dark chlorophyll biosynthesis.**

❀ **KEY WORDS:** chlorophyll biosynthesis; protochlorophyllide reduction.

❀ Информация об авторах:

Чекунова Елена Михайловна — СПбГУ, старший научный сотрудник. Университетская набережная 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия. E-mail: elena_chekunova@mail.ru.

Chekunova Elena Mikhaylovna — senior research fellow. The State University of Saint-Petersburg. Universitetskaya nab., 7/9, St.-Petersburg, Russia. 199034. E-mail: elena_chekunova@mail.ru.

УДК 575.174.015.3

© Ю. В. Михайлова[1, 3],
Г. Л. Гусарова[2, 3], К. Брохман[3]

[1] Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург
[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
[3] Национальный центр биосистематики, Университет г. Осло

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ СМОЛЕВКИ БЕССТЕБЕЛЬНОЙ *SILENE ACAULIS (L.) JACQ. (CARYOPHYLLACEAE)* НА СЕВЕРЕ ЕВРОПЫ И АРХИПЕЛАГЕ ШПИЦБЕРГЕН

❀ **С помощью мультилокусных маркеров AFLP была изучена молекулярная изменчивость в 49 популяциях *Silene acaulis*. Получены данные в пользу послеледниковой колонизации севера из рефугиумов, расположенных в горных районах юга Европы. Большинство северо-европейских популяций характеризуются низким уровнем генетического разнообразия и слабо выраженной генетической структурой, по сравнению с южными монтанными популяциями. Колонизация *Silene acaulis* высокоарктического архипелага Шпицберген осуществлялась из разных источников, среди которых наиболее значимым была восточная Гренландия.**

❀ **Ключевые слова**: филогеография; *Silene acaulis*; четвертичный период; AFLP; рефугиум; послеледниковая колонизация; аркто-альпийская флора.

Поступила в редакцию 23.04.2010.
Принята к публикации 15.07.2010.

ВВЕДЕНИЕ

Климатические изменения плейстоцена оказали значительный эффект на формирование арктической флоры. Сухой и холодный климат во время покровных оледенений сменялся относительно благоприятным в периоды межледниковий. Ледник отступал и распространялся неоднократно, изменяя места обитания живых организмов, которые были вынуждены мигрировать или погибать. Виды, приспособленные к суровому холодному климату, имели более широкое распространение по сравнению с их современным ареалом (Birks, 2008). Местом их обитания была обширная тундростепь. Виды более умеренного климата находили убежища (рефугиумы) на юге, на непокрытых льдом территориях. Таким образом, бореальные виды переживали «эффект бутылочного горлышка» в ледниковый период, тогда как приспособленные к экстремальным арктическим условиям — в периоды межледниковья.

Значительный вклад в изучение вопросов истории послеледникового расселения видов внесли филогеографические исследования последнего времени. Зная генетическое разнообразие и структуру видов, можно предположить, как формировались их современные ареалы. Области, которые были рефугиумами, должны иметь высокий уровень генетического разнообразия, тогда как территории, заселенные после отступления ледника, — более низкий из-за эффекта основателя и дрейфа генов. Исключением могут быть контактные зоны или зоны «швов» — участки, где мигранты из двух различных рефугиумов встретились во время послеледниковой реколонизации (Hewitt, 1996).

Для наиболее полной характеристики генетической изменчивости вида необходимо изучение достаточного числа локусов. С этой точки зрения наиболее интересны многолокусные маркеры, в частности, полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (AFLP) (Vos et al., 1995). Статистические подходы анализа многолокусных данных, включая методы Байесовской классификации, позволяют тестировать сложные филогеографические гипотезы, например, о географическом местонахождении ледниковых убежищ и происхождении современных популяций. Так, для голубики, ключевого компонента северных экосистем, с использованием хпДНК, ITS и AFLP показана очень сложная генетическая структура, которая объясняется быстрым распространением из ряда рефугиумов с формированием нескольких контактных зон (Eidessen et al., 2007-a).

Смолевка бесстебельная — аркто-альпийский вид, довольно обычный в тундровых и высокогорных сообществах (Кожанчиков и др., 1971). Вид представлен многолетними, подушковидными, насекомоопыляемыми и гинодвудомными растениями, причем в северных регионах доля гермафродитных особей меньше (Sastad, 1991). Изучение аллозимной изменчивости смолевки бесстебельной в популяциях с территории Шпицбергена, Норвегии, Исландии и Шотландии показало, что популяции из высокой Арктики (Шпицберген) имеют высокий уровень изменчивости, сходный с таковым, выявленным у более южных популяций (Abbott et al., 1995). Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов хпДНК, проведенный в этой же работе, выявил,

что все изученные популяции имели общий гаплотип. По этим результатам было сделано заключение о возможном послеледниковом заселении смолевкой бесстебельной северных территорий из южных рефугиумов. Выводы, полученные в работе Abbott et al. (1995), основаны на изучении аллозимной изменчивости лишь семи генных локусов.

Настоящая работа ставит своей целью изучить уровень и структуру генетического разнообразия *Silene acaulis* на европейском Севере с использованием мультилокусных маркеров AFLP, а также выявить географические территории, послужившие возможными источниками заселения этим видом архипелага Шпицберген. Кроме того, сравнение северо- и южноевропейских популяций послужит материалом для оценки гипотезы Abbott et al. (1995) о происхождении североевропейских популяций смолевки бесстебельной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе было использовано 250 растений вида *Silene acaulis* из 49 популяций, из основных мест распространения вида в Северной Европе (табл. 1). Для получения более точной информации об истории вида в анализ включено несколько популяций из ряда мест с юга Европы и востока Канады. Число растений на популяцию варьировало от 2 до 11. Для генетического анализа использовались образцы, высушенные в силикагеле. Весь материал в силикагеле и гербарий ваучеров ДНК хранятся в Ботаническом музее Университета Осло, Норвегия (O).

Выделение ДНК и AFLP фингерпринтинг

Тотальная ДНК выделялась из измельченной растительной ткани с помощью наборов DNeasy Plant 96 Kit и DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) согласно инструкциям производителя. Образцы ДНК хранятся в банке ДНК Национального центра биосистематики Университета Осло.

AFLP фингерпринтинг проводился с использованием рестриктаз *Eco*RI и *Mse*I согласно Gaudeul et al. (2000) с модификациями Alsos et al. (2007), за исключением того, что для этапа рестрикции-лигирования использовалось 5 µl выделенной ДНК. Для выбора подходящих комбинаций праймеров были протестированы 24 пары праймеров. Для дальнейшего анализа были выбраны следующие комбинации: *Eco*RI-AGA/*Mse*I-CTG, *Eco*RI-AGG/*Mse*I-CAG и *Eco*RI-AGC/*Mse*I-CTC. 2–3 µl флюоресцентно меченого продукта каждой из трех селективных ПЦР соединялись и растворялись в 14 µl очищенной воды перед смешиванием со стандартом GeneScan ROX 500 (Applied Biosystems) и формамидом, после чего анализировались на ABI3130x1 ДНК-секвенаторе (Applied Biosystems). Полученные хроматограммы были обработаны с использованием внутреннего стандарта в программе GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems) для установления длин полученных фрагментов. После этого фрагменты, различающиеся по длине менее, чем одна пара нуклеотидов (п. н.) были объединены вручную. В анализ были включены фрагменты размером от 50 до 500 п. н. Наличие или отсутствие фрагмента кодировалось как «1» или «0», соответственно.

Для контроля воспроизводимости маркеров были выполнены повторы на разных этапах анализа. Фрагменты с низкой повторяемостью были исключены из анализа. Повторные образцы были использованы для оценки ошибки по Bonin et al. (2004).

Анализ данных

Внутрипопуляционная изменчивость была рассчитана как генетическое разнообразие по Nei (Nei, 1987) с помощью утилиты AFLPdat (Ehrich, 2006) в программной среде R (R Development Core Team, 2004). Индекс редкости маркеров AFLP (DW) оценен с помощью понижающего взвешивания по частоте маркеров (Schönswetter, Tribsch, 2005), также с помощью AFLPdat. Для этого частота встречаемости конкретного маркера в популяции была разделена на сумму встречаемости этого же маркера во всем массиве данных. Индекс редкости маркеров и внутрипопуляционная изменчивость были рассчитаны для всех популяций с пятью индивидуумами в выборке.

Матрица с результатами AFLP была конвертирована в формат для программ ARLEQUIN, STRUCTURE и BAPS с помощью R-скрипта AFLPdat. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA: analysis of molecular variance) был проведен в программе ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2005), на основе попарного и иерархического сравнения образцов с использованием 1000 пермутаций.

Генетическая структура была проанализирована с помощью модель-ориентированных алгоритмов в компьютерных программах STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2007), BAPS 5 (Corander & Marttinen, 2006) и анализа главных координат в NTSYS-PC 2.02h (Rohlf, 1998). В программе STRUCTURE 2.2 оптимальное число групп популяций (K) определяется с помощью логарифма вероятности разделения индивидуумов по K числу групп, которое рассчитывается с использованием Байесовской кластеризации, основанной на модели Харди-Вайнберга. Анализ выполнялся на Биопортале Университета г. Осло (http://www.bioportal.uio.no/). Использовались две модели: “admixture” и “no admixture”. Для модели “admixture” возможно смешанное происхождение популяций, тогда как для модели “no admixture” предки представителей одной популяции могут принадлежать только к одному кластеру. Анализ для K от 1 до 10 проводился с 1 000 000 итерациями, при выжигании (burn-in) в 200 000 итераций, для каждого K анализ повторялся 10 раз. Графическое представление и анализ результатов осуществлялись с помощью утилиты Structure-sum 2009

Таблица 1

Популяции *Silene acaulis*, вошедшие в исследование

Код популяции	Число растений	Место сбора	Коллектор, год сбора	Y Координата (долготы)	X Координата (широты)
93-100	3	Шпицберген, Земля Уэдела Ярсберга (Wedel Jarlsberg Land)	CB, 1993	77	15,55
93-103	5	Шпицберген, Земля Уэдела Ярсберга (Wedel Jarlsberg Land)	CB, 1993	77,04	15,16
93-108	5	Шпицберген, Земля Норденшельда (Nordenskiold Land)	CB, 1993	77,51	14,5
93-148	5	Шпицберген, Земля Диксона(Dickson Land)	CB, 1993	78,4	14,38
93-151	5	Шпицберген, Земля Оскара II (Oscar II Land)	CB, 1993	78,4	14,38
93-156	4	Шпицберген, Земля Диксона (Dickson Land)	CB, 1993	78,52	15,95
93-169	5	Шпицберген, Земля Бунсов (Bunsow Land)	CB, 1993	78,58	16,44
93-191	3	Шпицберген, Земля Андре (Andree Land)	CB, 1993	79,67	14,27
93-196	5	Шпицберген, Земля Оскара II (Oscar II Land)	CB, 1993	78,22	13,84
93-215	5	Шпицберген, Земля Норденшельда (Nordenskiold Land)	AH, 1993	78,17	15,98
93-224	5	Шпицберген, Земля Норденшельда (Nordenskiold Land)	AH, 1993	78,23	15,43
93-240	3	Шпицберген, Земля Норденшельда (Nordenskiold Land)	CB, 1993	78,16	15,83
93-244	5	Шпицберген, Земля Сабин (Sabine Land)	AH, 1993	78,35	17
93-522	5	Шпицберген, Земля Норденшельда (Nordenskiold Land)	AH, 1993	77,87	15,32
93-272	5	Шпицберген, Земля Норденшельда (Nordenskiold Land)	AH, 1993	78,18	16,33
93-273	5	Шпицберген, Земля Норденшельда (Nordenskiold Land)	AH, 1993	78,19	15,52
93-285	5	Шпицберген, Земля Оскара II (Oscar II Land)	AH, 1993	78,84	12,17
93-293	5	Шпицберген, Земля Оскара II (Oscar II Land)	AH, 1993	78,92	11,95
93-307	5	Шпицберген, Земля Хокона VII (Haakon VII Land)	AH, 1993	78,83	12
93-316	5	Шпицберген, Медвежий остров (Bjørnøya)	VB, 1993	74,46	18,9
94-392	2	Норвегия, Сер-Треннелаг (Sør-Trøndelag)	CB, 1994	62,6	9,7
94-450	5	Норвегия, Бускеруд (Buskerud)	CB, MMT, TMG, 1994	60,63	8,56
94-454	5	Норвегия, Бускеруд (Buskerud)	CB, MMT, TMG, 1994	60,86	8,55
94-456	5	Норвегия, Оппланн (Oppland)	CB, 1994	61,13	8,57
94-522	5	Норвегия, Хураланн (Hordaland)	TMG, MMT, 1994	60,57	6,92
94-534	5	Норвегия, Оппланн (Oppland)	CB, MMT, TMG, 1994	61,84	8,57
AK-1345	11	Норвегия, Финмарк (Finnmark)	ØS, KH, 2004	70,07	30,11
AK-3131	6	Испания, Уэска (Huesca)	TG, JV, LV, 2004	42,14	−0,41
AK-3132	2	Испания, Уэска (Huesca)	TG, JV, LV, 2004	42,66	−0,59
CB-96-004	6	Испания, Каталония (Catalonia)	CB, 1996	42,18	2,49
CB-99-002	5	Гренландия, Земля Джеймса (Jameson Land)	CB, JN, PB, SK, 1999	70,75	−22,71
CB-99-037	5	Гренландия, Ливерпульская земля (Liverpool Land)	CB, JN, PB, SK, 1999	70,49	−21,95
HØG-95	9	Исландия, Странсисла (Strandsysla)	AKB, 1995	65,73	−22,1
SUP-04-006	6	Норвегия, Оппланн (Oppland)	HC, 2004	61,62	8,04
SUP-3011	5	Канада, Ньюфаундленд (Newfoundland)	IGA, AKB, 2004	51,36	−55,67
SUP-3013	5	Россия, республика Коми	IGA, AT, 2004	65,3	60,67
SUP-3019	6	Канада, Квебек (Quebec)	IGA, AKB, 2004	48,93	−66,18
SUP-3078	5	Шпицберген, Земля Серкап (Sørkapp Land)	MHJ, IS, 2004	76,94	15,88
SUP-3085	6	Шпицберген, Земля Уэдела Ярсберга (Wedel Jarlsberg Land)	MHJ, IS, 2004	77,07	15,18
SUP-3114	6	Польша, Краков, Татры (Krakow, Tatra Mts.)	PS, MR, 2004	49,24	19,91
SUP-3126	5	Шпицберген, Земля Уэдела Ярсберга (Wedel Jarlsberg Land)	MHJ, IS, 2004	77,01	15,57
SUP-3133	5	Шпицберген, Земля Уэдела Ярсберга (Wedel Jarlsberg Land)	MHJ, IS, 2004	77,01	15,57
SUP-4212	5	Польша, Краков, Татры (Krakow, Tatra Mts.)	PS, MR, 2004	49,17	20,14
SUP-4485	5	Россия, Ямало-Ненецкий АО, Полярный Урал	MK	65,45	66,84
SWS-97-310	10	Гренландия, Местерсвик (Mestersvik)	EH, 1997	72,25	−23,97
TMG-44	6	Соединенное Королевство, Шотландия, Аргайл, (Scotland, Argyll county)	TMG, SWS, KTH, MT, KWa, 1997	56,64	−5,03
TMG-52	2	Соединенное Королевство, Шотландия, Инвернесс, (Scotland, Inverness)	TMG, SWS, KTH, MT, KWa, 1997	56,8	−5
TMG-58	4	Соединенное Королевство, Шотландия, Пертшир, (Scotland, Perthshire)	TMG, SWS, KTH, MT, KWa, 1997	56,54	−4,22
ZSNG	5	Гренландия, Исследовательская станция Закенберг (Zackenberg Station)	KWe, KB, TD	74,47	−20,57

Инициалами обозначены коллекторы растительного материала: AH — A. Håpenes, AKB — A. K. Brysting, AT — A. Tribsch, CB — C. Brochmann, EH — E. Hartz, HC — H. Carlsen, IGA — I. G. Alsos, IS — I. Skrede, JN — J. Nylehn, JV — J. Vallès, KB — K. Bakke, KH — K. Hansen, KT — M. Tebbitt, KTH — K. T. Hansen, KWa — K. Watson, KWe — K. Westergaard, LV — L. Villar, MHJ — M. H. Jørgensen, MK — M. Kapralov, MMT — M. M. Tollefsrud, MR — M. Ronikier, ØS — Ø. Stensrud, PB — P. Bronken, PS — P. Schönswetter, SK — S. Kjølner, SWS — S. W. Steen, TD — T. Dahl, TG — T. Garnatje, TMG — T. M. Gabrielsen, VB — V. Bakken.

(Ehrich, 2006; Ehrich et al., 2007; www.nhm.uio.no/ncb) в среде R. В BAPS 5 используются байесовский подход и алгоритм стохастической оптимизации для оценки логарифма правдоподобия партиции, которая разделяет все индивидуумы на определенное число кластеров (K). Данные были проанализированы с помощью программы BAPS 5 троекратно при максимальных значениях K равных 30. Кроме того, анализ генетической структуры проводился с помощью метода главных координат на основе коэффициента сходства Дайса в NTSYS-PC 2.02h.

Определение вероятныхх предковых популяций, заселявших архипелаг Шпицберген (assignment test) проводилось с помощью программы AFLPOP (Duchesne, Bernatchez, 2002). Набор данных был разделен на группы, согласно их географической принадлежности. Каждая из групп тестировалась как возможная предковая популяция для растений Шпицбергена. Правдоподобие определялось на основе сравнения частот маркеров AFLP. Идентификация предковых популяций считалась достоверной при различии значений логарифмов правдоподобия больше, чем три.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью трех комбинаций праймеров было успешно проанализировано 212 растений из 49-ти популяций по 279 полиморфным локусам. Ошибка была рассчитана из 66 повторно выполненных образцов, ее значение не превосходило 2,4 %. Фрагменты, полиморфные в числе образцов, составляющих менее 2,4 % от общего количества, исключались из анализа, кроме тех случаев, когда они были характерны для группы популяций из одного региона и, таким образом, несли смысловую нагрузку. В анализе были использованы следующие наборы данных: Европа вместе с востоком Канады (279 полиморфных локусов), только Европа (272 полиморфных локуса), северная Европа (240 полиморфных локусов), южная Европа вместе с Уралом (204 полиморфных локуса) и отдельно высокоарктический архипелаг Шпицберген (197 полиморфных локусов).

Генетическое разнообразие

Внутрипопуляционное генетическое разнообразие, посчитанное по Nei, варьировало от 0,06 до 0,19 (рис. 1А). Максимальные значения наблюдались в популяции из Пиренеев (0,19), относительно велики значения были в популяциях из Карпат (0,17) и разных частей Норвегии (0,14-0,16), а также в двух популяциях с архипелага Шпицберген, одна из которых обитает на острове Медвежий (0,14). Крайне низкий уровень генетического разнообразия наблюдался в популяции из Квебека (0,06), невысокие значения были характерны для нескольких популяций из Шпицбергена и одной из Гренландии (0,08–0,10).

Значение индекса частоты редких аллелей (DW) варьировало от 4,8 до 23,0 (рис. 1Б). Высокая частота редких аллелей наблюдалась в популяциях из Пиренеев

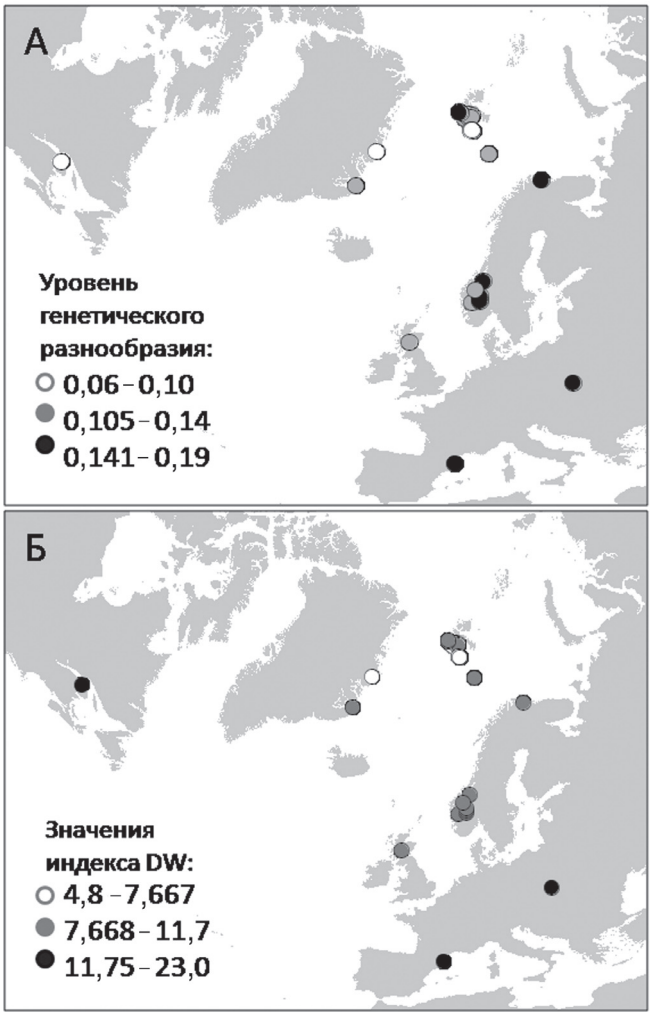

Рис. 1. Внутрипопуляционное разнообразие (А) и индекс частоты редких аллелей (Б) в популяциях *Silene acaulis*

(23,0), Карпат (19,9), а также Квебека (15,9). Среди североевропейских популяций большие значения индекса наблюдались у растений из разных частей Норвегии (9,2–11,7), Шотландии (11,2), одной популяции из Гренландии (11,4), ряда популяций со Шпицбергена (10,2–8,6), среди них из острова Медвежий (8,6). Очень низким значение DW было у ряда популяций с острова Западный Шпицбергена (4,8–5,0).

Генетическая структура

Анализ всего амфиатлантического набора данных с помощью метода главных координат (PCo) показывает значительное отделение представителей *Silene acaulis* с востока Канады от европейских (рис. 2Г). При обработке наборов данных, включавших как популяции с обоих берегов Атлантики (рис. 2Г), так и только из Европы (рис. 2А) было выявлено, что европейские популяции разделяются на северные и южные по первому фактору (около 15 % общей изменчивости). По второму фактору (3,5 %) не было выявлено значительных различий. По третьему фактору

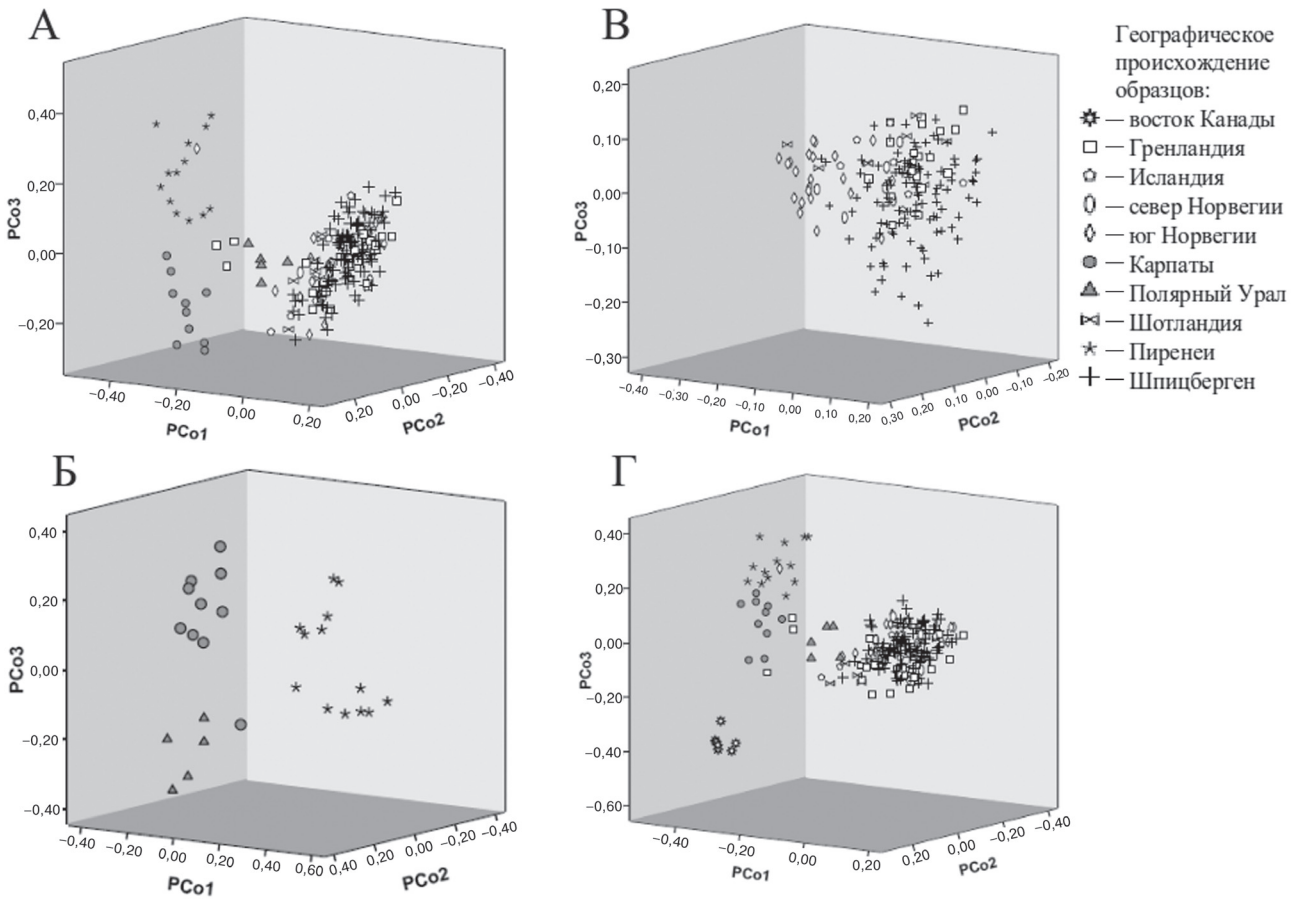

Рис. 2. Генетическая структура популяций *Silene acaulis* (метод выделения главных координат): европейские растения (А), южноевропейские и уральские растения (Б), североевропейские растения (В), растения Европы и востока Канады (Г). PCo — главная координата

(3,5 %) расходятся популяции с юга и центра Европы: Пиренеев и Карпат. Южноевропейские популяции формируют две небольшие близкие группы на графике, тогда как северные показывают значительный разброс. Отдельный анализ популяций из Полярного Урала, Пиренеев и Карпат выявил группы, соответствующие географическому происхождению образцов (рис. 2Б). Отдельный анализ севера Европы показал некоторую обособленность популяций юга Норвегии и Шотландии (рис. 2В.). Сравнение популяций архипелага Шпицберген с помощью PCo не выявило какой-либо генетической структуры.

В анализе STRUCTURE число групп отличалось при использовании различных моделей. В более простой модели «no admixture» было выявлено пять кластеров: канадский, пиренейский и уралокарпатский и два североевропейских (рис. 3А). Североевропейские растения разделились на две перекрывающиеся группы, причем растения из одной популяции принадлежали, в некоторых случаях, к разным генетическим группам. Несколько растений из двух популяций с севера Европы попадали в южноевропейскую группу. С использованием модели «admixture», которая учитывает возможность происхождения популяций от разных кластеров, было идентифицировано четыре генетические группы: канадская, южноевропейская и две североевропейских (рис. 3Б). Пиренейские, карпатские и уральские растения оказались в одной южноевропейской, или монтанной, группе. 21 образец из Гренландии, Норвегии и Западного Шпицбергена трудно было однозначно отнести к одной из двух групп.

Программой BAPS было идентифицировано четыре кластера, по составу сходных с генетическими группами, выявленных STRUCTURE при модели «admixture» (рис. 3В).

AMOVA — анализ молекулярной дисперсии

По результатам AMOVA (табл. 2) большая доля изменчивости (79,62 %) приходится на общую внутрипопуляционную изменчивость. При иерархических анализах значительные доли молекулярной дисперсии были между канадскими и европейскими растениями (31,33 %), меньше при разделении европейских популяций на северные и южные (14,39 %), а также между четырьмя группами (север Европы, Пиренеи, Карпаты, Урал — 11,83 %). Анализ североевропейских и шпицбергенских

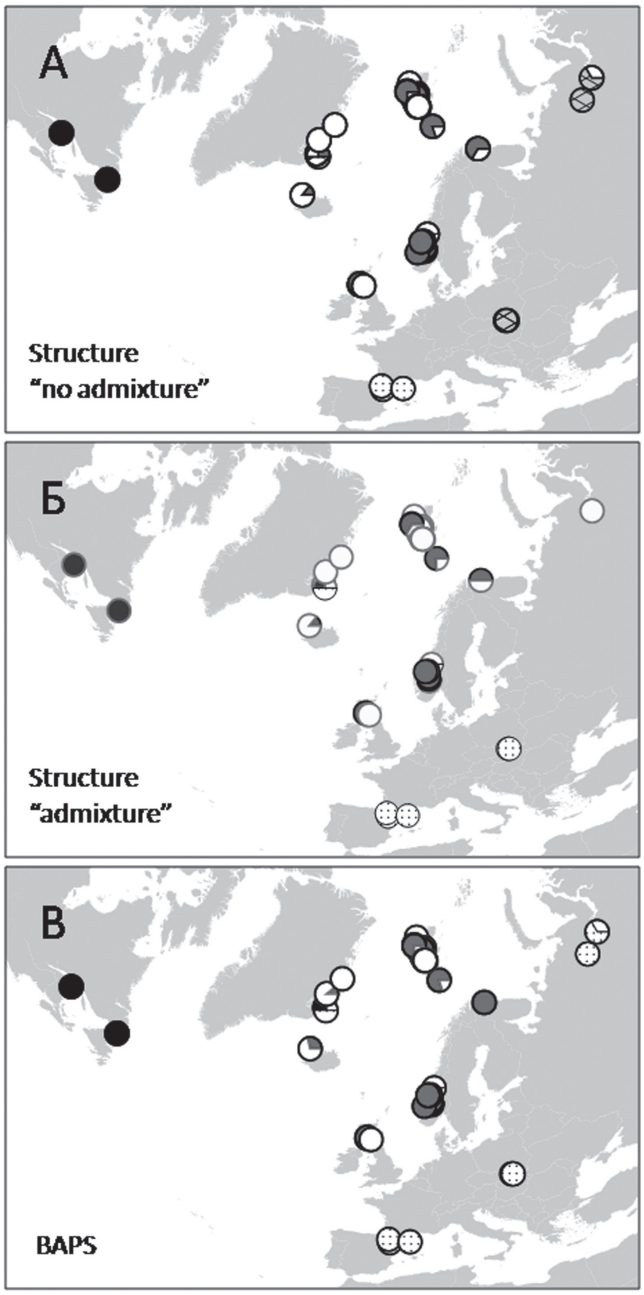

Рис. 3. Генетическая структура популяций *Silene acaulis* согласно кластеризации в программе STRUCTURE, модель «no admixture» (А), в программе STRUCTURE, модель «admixture» (Б) и в программе BAPS (В). Раскрашенные и исчерченные кружочки отражают принадлежность к генетическим группам. Двухцветные кружочки показывают генетически гетерогенные популяции

популяций показал, что доля внутрипопуляционной изменчивости значительно превосходит межгрупповую.

Тест определения вероятных предковых популяций

В качестве вероятных предковых популяций для архипелага Шпицберген были выбраны популяции южной и северной Норвегии, Урала, западной Гренландии, Шотландии, Исландии, Пиренеев и Карпат. Из 112 проанализированных шпицбергенских образцов *Silene acaulis* 46 были отнесены к гренландской популяции. Несколько растений были отнесены к родительским популяциям из Исландии (9) и южной Норвегии (8). 49 растений не распределились ни в одну из предложенных популяций (рис. 4).

Рис. 4. Тест локализации возможных родительских популяций *Silene acaulis* на Шпицбергене. По оси ординат — число растений

ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень внутрипопуляционного генетического разнообразия у *Silene acaulis* (0,06–0,19) сходен и даже превышает таковой у ряда арктических растений, таких как *Draba fladnizensis* 0,02–0,11, *D. nivalis* 0,01–0,11 (Skrede et al., 2009), *Arabis alpina* 0–0,108 (Ehrich at al., 2007) и *Cassiope tetragona* 0,068–0,126 (Eidessen et al., 2007-b). Оценки генетического разнообразия *Silene acaulis* в Европе, полученные по аллозимным маркерам, выявили полиморфизм по 90 % локусов по сравнению с 50 % типичными для растений в среднем (Abbot et al., 1995). Такой высокий уровень генетического разнообразия, скорее всего, связан с высокой степенью аутбридинга в популяциях смолевки бесстебельной. Это подтверждают и результаты AMOVA: значительная часть молекулярной дисперсии, выявленной с помощью AFLP, объясняется внутрипопуляционной изменчивостью (табл. 2). Высокая внутрипопуляционная изменчивость наряду с низким уровнем дифференциации между популяциям ожидаемы именно для перекрестно-опыляемых видов. Это согласуется с предположениями о значительном межпопуляционном потоке генов, присутствовавшим как в прошлом при заселении смолевкой Европы, так и в настоящем, в результате синхронизации времени созревания семян и сезонных миграций птиц с севера на юг (Skye 1989; Crawford & Abbott 1994; Abbot et al., 1995).

Таблица 2

Результаты AMOVA

Источник дисперсии		d.f.	Сумма квадратов	Процент дисперсии
Одна группа: популяции амфиатлантики	между популяциями внутри популяций	48 170	1940,44 2933,83	23,15 76,85
Две группы: Европа и восток Канады	между группами между популяциями внутри популяций	1 47 170	176,29 1764,15 2933,83	31,33 14,37 54,30
Одна группа: популяции Европы	между популяциями внутри популяций	46 165	1759,60 2933,92	20,38 79,62
Две европейские группы: северная и монтанная	между группами между популяциями внутри популяций	1 45 165	142,22 1617,38 2933,92	14,39 14,75 70,86
Три европейские группы: монтанная и две северные (по BAPS и Structure «admixture»)	между группами между популяциями внутри популяций	2 44 165	295,61 1463,99 2933,92	8,72 14,88 76,4
Четыре европейские группы: Пиренеи, Карпаты с Уралом и две северные (по Structure «no admixture»)	между группами между популяциями внутри популяций	3 43 65	416,06 1343,54 2933,92	11,83 12,79 75,39

Генетическая дифференциация наиболее выражена между канадскими и европейскими популяциями. Различиями между этими группами объясняются 31,33 % молекулярной дисперсии всех исследованных индивидуумов. Вероятно, поток генов между Канадой и Европой обусловлен только событиями прошлого, например, заселением американского континента смолевкой бесстебельной в период распространения вида по северному полушарию. Канадские и европейские популяции могли происходить из разных рефугиумов. В пользу отдельного рефугиума и собственной истории канадской *Silene acaulis* говорит и высокий индекс редкости аллелей в популяции из Квебека. Рефугиум для восточноканадских растений мог располагаться на юго-востоке Лаврентийского ледникового щита, как для *Cassiope tetragona* (Eidesen et al., 2007-b).

Европейские популяции хорошо дифференцируются на северную и южную группы, которые также можно назвать арктической и монтанной (рис. 2, 3). Такой паттерн наблюдается и у ряда других аркто-альпийских видов: *Dryas octopetala* (Skrede et al., 2006), *Vaccinium uliginosum* (Eidesen et al., 2007-a), *Draba fladnizensis* (Skrede et al., 2009). Монтанная группа оказывается неоднородна, и, в свою очередь, ее можно разделить. Результаты анализов STRUCTURE с использованием модели «no admixture» и AMOVA говорят в пользу дивергенции группы на восточную (Урал и Карпаты) и западную (Пиренеи). Южноевропейские популяции могли дифференцироваться и накопить генетические отличия в плейстоцене в условиях изоляции. Скорее всего, во время оледенения, когда тундровые растения типа дриады (Skrede et al., 2006) были широко распространены в тундростепях, окаймляющих ледники, *Silene acaulis* сохранялась в южных рефугиумах. Высокий уровень генетического разнообразия вместе с большими значениями индекса редкости локусов AFLP в популяциях юга Европы свидетельствует в пользу альпигенного происхождения северных популяций смолевки бесстебельной. Наличие плейстоценовых рефугиумов в регионах юга Европы показано как для растительных видов, так и для животных, например, короткокрылого конька, бурого медведя, ряда землероек, полевок и тритонов (Taberlet et al., 1998; Kotlik at al., 2006).

Генетическая структура североевропейских растений (северная группа) выражена гораздо слабее. Межпопуляционный поток генов в этом случае достаточно высок, для того, чтобы предотвратить дивергенцию популяций в результате случайного дрейфа генов. Растения с архипелага Шпицберген попадают в те же две слабодифференцированные группы, что и остальные североевропейские индивидуумы, это подчеркивает тесную историческую связь островных и материковых растений. Наиболее вероятными источниками во время послеледниковой колонизации архипелага являются популяции Гренландии, в гораздо меньшей степени Исландии и южной Норвегии. Для других видов, обитающих на Шпицбергене, показано, что они могли расселяться из Урала *(Rubus chamaemorus, Betula nana, Dryas octopetala)*, северной Норвегии (*Salix herbaceae*, в меньшей степени *Betula nana* и *Dryas octopetala*) и Гренландии *(Cassiope tetragona, Empetrum nigrum)* (Alsos et al., 2007). Значительное число (44 %) протестированных растений архипелага оказалось невозможным отнести к какой-либо из предложенных в качестве предковых популяций. Это можно объяснить неполным представлением вероятных родительских популяций, включенных в анализ. Например, в исследование не попали растения из северонорвежского региона Трумс и западной Гренландии. С дру-

гой стороны, низкий уровень внутрипопуляционного разнообразия мог повлиять на результаты, которые в этом случае не получили достаточной статистической значимости. Можно лишь сказать с уверенностью, что заселение архипелага Шпицберген происходило разными путями, и одним из основных источников послужила восточная Гренландия.

Филогеографический паттерн *Silene acaulis* в Европе, выявленный с помощью AFLP, свидетельствует в пользу гипотезы, выдвинутой Abbot et al. (1995) о происхождении северных Европейских популяций от мигрантов с юга Европы в конце последнего ледникового периода. Однако, относительно высокие значения индекса редких аллелей у некоторых северных популяций, позволяет предположить возможное существование местного северного рефугиума. Южный ледниковый рефугиум мог располагаться в районе Восточных Альп. Например, показано, что аркто-альпийский вид *Ranunculus glacialis* расселился после отступления ледника на север Европы именно из Восточных Альп (Schönswetter et al., 2003). Северный гипотетический рефугиум мог быть на территории Скандинавии. Несмотря на то, что Скандинавский полуостров был покрыт ледниковым щитом, относительно большой уровень эндемизма позволил предположить существование на его территории локальных рефугиумов на возвышающихся над ледником горах (нунатаках) и на шельфе северного моря, который был сушей во время оледенений (Dahl, 1987). На возможность существования таких рефугиумов указывается, в частности, для норвежских леммингов (Fedorov, Stenseth, 2001). Использование смолевкой нунатаков в качестве убежища малоправдоподобно из-за суровых условий последних, однако, вероятность существования популяций на шельфе нельзя полностью исключить.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке стипендии Исследовательского совета (International Stipend of Recearch council of Norway) правительства Норвегии и Национального центра биосистематики Норвегии Университета Осло, а также программы Президиума РАН «Биоразнообразие». Особую благодарность авторы выражают коллекторам материала, а также рецензентам за ценные критические замечания.

Литература

1. *Кожанчиков В. И., Маценко А. Е. Петровский В. В. и др.,* 1971. Арктическая флора СССР VI *Caryophyllaceae — Ranunculaceae* / под. ред. А. И. Толмачёва. Л.: Наука. 248 с.
2. *Abbott R. J., Chapman H. M., Crawford R. M., Forbes D. G.,* 1995. Molecular diversity and derivations of populations of Silene acaulis and *Saxifraga oppositifolia* from the high Arctic and more southerly latitudes // Mol. Ecol. Vol. 4. P. 199–207.
3. *Alsos I. G., Eidesen P.B., Ehrich D. et al.,* 2007. Frequent long-distance plant colonization in the changing Arctic // Science. Vol. 316. P. 1606–1609.
4. *Alsos I. G., Engelskløn T., Gielly L. et al.,* 2005. Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity: insights from an ecological key species // Mol. Ecol. Vol. 14. P. 2739–2753.
5. *Birks H. H.,* 2008. The Late-Quaternary history of arctic and alpine plants // Plant Ecology & Diversity Vol. 1 P. 135–146.
6. *Bonin A., Bellemain E., Eidessen P.B. et al.,* 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies // Mol. Ecol. Vol. 13. P. 3261–3273.
7. *Corander J., Martinnen P.,* 2006. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers // Mol. Ecol. Vol. 15. P. 2833–2843.
8. *Crawford R. M. M., Abbott R. J.,* 1994 Pre-adaptetion of Arctic plants to climatic change // Botanica Acta. Vol. 107. P. 271–278.
9. *Dahl E.,* 1987. The nunatak theory reconsidered // Ecological Bulletins. Vol. 38. P. 77–94.
10. *Duchensne P., Bernatchez L.,* 2002. AFLPOP: a computer program for simulated data and real population allocation, based on AFLP data // Mol. Ecol. Notes. Vol. 2. P. 380–383.
11. *Ehrich D.,* 2006. AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data // Mol. Ecol. Notes. Vol. 6. P. 603–604.
12. *Ehrich D., Gaudeul M., Assefa A. et al.,* 2007. Genetic consequences of Pleistocene range shifts: Contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains // Mol. Ecol. Vol. 16. P. 2542–2559.
13. *Eidessen P.B., Alsos I. G., Popp M. et al.,* 2007-a. Nuclear vs. plastid data: complex Pleistocene history of a circumpolar key species // Mol. Ecol. Vol. 16. P. 3902–3925.
14. *Eidessen P.B., Carlsen T., Molau U., Brochmann C.,* 2007-b. Repeatedly out of Beringia: *Cassiope tetragona* embraces the Arctic // J. Biogeogr. Vol. 34. P. 1559–1574.
15. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.,* 2005. ARLEQUIN, Version 3. 0: an Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis // Evolutionary Bioinformatics Online. Vol. 1. P. 47–50.
16. *Falush D., Stephens M., Pritchard J.,* 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles // Mol. Ecol. Notes. Vol. 7. P. 574–578.
17. *Fedorov V. B., Stenseth N. C.,* 2001. Glacial survival of the Norwegian lemming *(Lemmus lemmus)* in Scandinavia: inference from mitochondrial DNA variation. // Proc. Royal Soc. B. Vol. 268. P. 809–814.
18. *Gaudeul M., Taberlet P., Till-Bottraud I.,* 2000. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum L. (Apiaceae)*, inferred from amplified fragment length polymorphism markers // Mol. Ecol. Vol. 9. P. 1625–1637.
19. *Hewitt G. M.,* 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation // Biol. J. Linn. Soc. Vol. 58. P. 247–276.

20. *Kotlik P., Deffontaine V., Mascheretti S. et al.,* 2006. A northern glacial refugium for bank voles *(Clethrionomys glareolus)* // PNAS. Vol. 103 (40). P. 14860–14864.
21. *Nei M.,* 1987. Molecular Evolutionary Genetics. NY: Columbia University Press. 512 p.
22. *Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P.,* 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data // Genetics. Vol. 155. P. 945–959.
23. R development Core Team. A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. 2004. URL: http://r-development-core-team.software.informer.com
24. *Rohlf F.,* 1998. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2. 02. - NY: Exeter Software, Setauket.
25. *Sastad S. J.,* 1991. Gynodioiki en populasion av fjellsmelle, Silene acaulis, ved Ny-Alesund, Svalbard // Blyttia. Vol. 4. P. 161–165.
26. *Schönswetter P., Paun O., Tribsch A., Niklfeld H.,* 2003. Out of the Alps: colonization of Northern Europe by East Alpine populations of the Glacier Buttercup *Ranunculus glacialis L. (Ranunculaceae)* // Mol. Ecol. Vol. 12. P. 3373–3381.
27. *Schönswetter P., Tribsch A.,* 2005. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum L. (Apiaceae)* // Taxon. Vol. 54. № 3. P. 725–732.
28. *Skrede I., Borgen L., Brochmann C.,* 2009. Genetic structuring in three closely related circumpolar plant species: AFLP versus microsatellite markers and high-arctic versus arctic-alpine distributions // Heredity. Vol. 102. P. 293–302.
29. *Skrede I., Eidessen P. B., Portela R. P., Brochmann C.,* 2006. Refugia, differentiation and postglacial migration in arctic-alpine Eurasia, exemplified by the mountain avens *(Dryas octopetala)* // Mol. Ecol. Vol. 15. P. 1827–1840.
30. *Skye E.,* 1989. Changes to climate and flora of Hopen Island during the last 110 years // Arctic. Vol. 42. P. 323-332.
31. *Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G., Cosson J. F.,* 1998 Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe // Mol. Ecol. Vol. 7. P. 453–464.
32. *Vos P., Hoges R., Bleeker M. et al.,* 1995. A new technique for DNA fingerprinting // Nucl. Acids Res. Vol. 23. P. 4407–4414.

MOLECULAR VARIATION AND PHYLOGEOGRAPHY OF THE MOSS CAMPION *SILENE ACAULIS (L.) JACQ. (CARYOPHYLLACEAE)* IN THE NORTH OF EUROPE AND THE SVALBARD ARCHIPELAGO

Mikhaylova Y. V.[1, 3], *Gussarova G. L.*[2, 3], *Brochmann C.*[3]

❀ **SUMMARY: Molecular variation in 49 populations of *Silene acaulis* was studied using AFLP multilocus markers. Data obtained support postglacial colonization of the North the from southern European mountain refugia. Most of the northern European populations are characterized by lower genetic diversity and poor genetic structure, as compared to the southern mountain populations. High Arctic archipelago Shpitsbergen have been colonized by *Silene acaulis* from several sources, of which the most significant is eastern Greenland.**

❀ **KEY WORDS:** phylogeography; *Silene acaulis*; Quartenary; refugium; postglacial colonization; arctic-alpine flora.

❀ Информация об авторах

Михайлова Юлия Владимировна — аспирант.
Лаборатория растительности Крайнего Севера, Ботанический институт имени В. Л. Комарова Российской Академии Наук,
193022 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2.
E-mail: mjulka@gmail.com.

Гусарова Галина Леонидовна — к. б. н., научн. сотр.
Кафедра ботаники, Биолого-почвенный факультет, Санкт-Петербургский государственный университет.
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9.
E-mail: galina.gusarova@nhm.uio.no.

Брохман Кристиан — профессор, руководитель Национального Центра биосистематики.
Университет Осло, Норвегия,
NO-0318, Oslo, P.O. Box 1172 Blindern.
E-mail: christian.brochmann@nhm.uio.no.

Mikhaylova Yulia Vladimirovna — PhD student.
Laboratory of the Farth North vegetation, Komarov Botanical Institute Russian Academy of Science.
Professora Popova st. 2, Saint Petersburg, Russia, 193022.
E-mail: mjulka@gmail.com.

Gusarova Galina Leonidovna — PhD, scientist.
Saint-Petersburg State University, Department of Botany, Faculty of Biology and Soil Science,
Universitetskaya 7/9, Saint Petersburg, Russia, 199034
E-mail: galina.gusarova@nhm.uio.no.

Brochmann Christian — professor, leader of the National Centre for Biosystematics.
University of Oslo, Norway.
NO-0318, Oslo, P.O. Box 1172 Blindern
E-mail: christian.brochmann@nhm.uio.no.

УДК 575.174.4:575.21:595.768.12

© М. Б. Удалов,
Г. В. Беньковская

Учреждение РАН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ПОЛИМОРФИЗМА В ПОПУЛЯЦИЯХ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

❀ **В статье представлены данные об изменении фенетической структуры популяций колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say на Южном Урале (территория республики Башкортостан). Отмечено снижение уровня фенетического полиморфизма за период с 1994 по 2002 гг. Данные лабораторных токсикологических экспериментов позволяют считать селективное действие инсектицидов основным фактором снижения уровня внутрипопуляционного полиморфизма.**

❀ **Ключевые слова**: колорадский жук; *Leptinotarsa decemlineata* Say; динамика популяционной структуры; фенетика популяций; генетика популяций; полиморфизм; Южный Урал.

Поступила в редакцию 31.12.2009.
Принята к публикации 15.07.2010.

ВВЕДЕНИЕ

История формирования вторичного ареала колорадского жука *(Leptinotarsa decemlineata* Say*)* тесно связана с хронологией появления и распространения резистентных к инсектицидам популяций данного вида (Рославцева, 2009; Удалов и др., 2009). Предполагается, что экспансия, имеющая характер «экологического взрыва» (Фасулати, 2002), обусловлена высоким уровнем внутривидового полиморфизма и относительной эволюционной молодостью, с чем связывают поразительную пластичность и приспособляемость вида (Ушатинская, 1981; Фасулати, 2002; Tower, 1906).

Для успешного контроля и регуляции численности колорадского жука явно недостаточно заниматься только разработками новых инсектицидов или выведением устойчивых сортов картофеля. Необходимо (в рамках интегрированной системы защиты пасленовых от колорадского жука) больше внимания уделять анализу структуры его популяции. Первый шаг на этом пути — поиск и оптимизация методов и подходов выявления и анализа полиморфизма данного вида, как фенетического, так и ДНК (Удалов и др., 2003; Удалов и др., 2009).

Наиболее часто для изучения внутривидового полиморфизма в популяциях насекомых используется фенетический анализ. В качестве дискретно изменяющихся признаков — фенов — у колорадского жука можно выделить вариабельность рисунка покровов тела имаго и личинок, жилкование крыльев, окраску яиц. Из всего этого разнообразия чаще всего используются фены рисунка покровов имаго, в частности — фены темени, затылка, переднеспинки и элитр (Кохманюк, 1981; Фасулати, 1985; Еремина, Денисова, 1987; Климец, 1997; Зелеев, 2002; Беньковская и др., 2004; 2008б).

В популяциях такого полиморфного вида, как колорадский жук, должны происходить процессы, приводящие к изменению генофонда и, как следствие, фенофонда популяций. В качестве примеров можно привести работы, показывающие изменения в фенетической структуре популяций колорадского жука как за продолжительный период времени (Еремина, Денисова, 1987; Овчинникова и др., 1984; Фасулати, 1985; Зелеев, 2002), так и под влиянием кормовой составляющей — сортов картофеля (Фасулати и др., 1994), других растений семейства *Solanacea* (Фасулати, Карасева, 1998; Беньковская, 2007) и инсектицидов. Изменение фенетической структуры популяций колорадского жука под влиянием последнего фактора было показано для локальных популяций Липецкой (Еремина, Денисова, 1987), Брестской и Липецкой областей (Овчинникова и др., 1982; Климец, 1988), Московской и Липецкой областей (Рославцева, Еремина, 2005). К сожалению, в большинстве данных работ используется материал по полиморфизму только одного фена.

Таким образом, можно сделать следующие заключения — во-первых, анализ популяционной структуры ареала колорадского жука (как и любого другого полиморфного и эволюционирующего вида) необходимо проводить систематически, чтобы иметь полное представление о ее временной динамике. Второе — явно недостаточно использование в анализе популяционной структуры колорадского жука только одного типа фенов, как это делается в большинстве цитируемых выше публикаций. Увеличение в работе их количества даст возможность оценить структуру популяций по гораздо большему числу маркерных признаков. Третье — в популяционных исследованиях необходимо учитывать различные факторы, оказывающие влияние на динамику популяционной струк-

туры вида. Таким образом, целью нашей работы являлась оценка роли многократного повторяющегося воздействия инсектицидов как фактора, влияющего на фенетическую структуру популяции колорадского жука на территории республики Башкортостан.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследований были использованы перезимовавшие имаго колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. Сбор колорадского жука проводился вручную с посадок картофеля в ряде районов Башкортостана, по диагональной линии участка через каждые 10–15 метров, по 1–2 экземпляра имаго с куста. Подобная методика сбора позволяет получить максимально разнообразную выборку материала (Амирханов, 1995).

Для анализа фенетического полиморфизма использовались фены рисунка темени (Климец, 1997), затылка (Беньковская и др., 2004, 2008а, 2008б), пронотума (Фасулати, 1985) и элитр (Климец, 1997).

Определение чувствительности колорадского жука к инсектицидам проводили топикальным методом рабочим раствором инсектицида фоксим (препарат Волатон) в дозе 1 мкл/особь как описано нами ранее (Беньковская и др., 2008а).

Анализ внутрипопуляционного разнообразия проводили с использованием двух показателей, предложенных Л. А. Животовским — среднего числа вариаций μ и доли редких вариаций h с их выборочными ошибками s_μ и s_h:

$$\mu = \left(\sum_{1}^{m} \sqrt{p_m}\right)^2,$$

$$s_\mu \approx \sqrt{\frac{\mu(m-\mu)}{N}},$$

$$h = 1 - \frac{m}{m},$$

$$s_h \approx \sqrt{\frac{h(1-h)}{N}},$$

где m — количество вариаций в популяции, p — частота вариации, N — объем выборки (Животовский, 1991).

Достоверность различий между частотами вариаций оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (Лакин, 1990).

Расчеты по всем приведенным показателям и визуализацию полученных данных проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 2003 (1985–2003, Microsoft Corporation). Графически структуру популяций изображали в виде полигонов Дебеца (Животовский, 1991), откладывая на радиусах значения частот вариаций фенов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В Башкортостане колорадский жук впервые появился в 1976 г в двух районах — Кумертауском и Архангельском, в очагах общей площадью 22 га (Прогноз появления и распространения вредителей.., 1978; Мигранов, 1994). Очаги, судя по официальным сообщениям, были быстро ликвидированы и при систематических обследованиях вредитель обнаружен не был. В 1977 г. новый очаг колорадского жука был выявлен в Альшеевском районе на площади 0,01 га. Уже к 1979 г. колорадский жук заселил всю территорию республики Башкортостан.

Нами были рассмотрены различия в структуре локальных популяций колорадского жука на территории Башкортостана, происходившие в течение ряда лет. В качестве экспериментальной модели была выбрана старомусинская локальная популяция (Кармаскалинский район Башкортостана), выборки 1994 и 2002 годов.

Различия между частотами вариаций фенов в выборках из данной локальной популяции, разделенными во времени периодом в 8 лет, статистически достоверны для фенов рисунка темени и пронотума ($p < 0{,}001$), однако недостоверны для рисунка элитр.

На рисунке 1 видно, что за период с 1994 по 2002 гг. изменения оказались более выражены для фена темени и пронотума чем для элитр. Так, частота вариации фена темени «m» возросла с 0,08 до 0,34, вариации «ш», «З» и «М» обнаружены не были, в два раза возросла частота вариаций фена пронотума «3», «6» и «9», резко сократились частоты вариаций «1» и «7».

Подобная тенденция изменения фенетической составляющей структуры популяции (уменьшение и исчезновение частот одних вариаций на фоне увеличения других) неизбежно должна привести к снижению уровня полиморфизма (фенетического разнообразия) в популяциях.

Действительно, в рассматриваемой нами локальной популяции отмечено изменение уровня фенетического разнообразия колорадского жука. В большей степени такие изменения проявлялись для фенов рисунка темени и пронотума (различия статистически достоверны при $p < 0{,}001$), в меньшей — для элитр (рис. 2). Среднее число вариаций μ для фена темени снизилось с $3{,}64 \pm 0{,}157$ в 1994 г. до $1{,}95 \pm 0{,}291$ в 2002 г. (в 1,9 раза), для фенов пронотума — с $8{,}38 \pm 0{,}162$ до $6{,}41 \pm 0{,}49$ (в 1,3 раза), для фенов элитр с $2{,}30 \pm 0{,}174$ до $1{,}92 \pm 0{,}291$ (в 1,2 раза).

Обратная тенденция отмечена для такого показателя, как доля редких вариаций h, характеризующего структуру внутрипопуляционного разнообразия (рис. 2). В частности, за период с 1994 по 2002 гг. значение данного показателя для фена темени возросло в 2,2 раза (с 0,27 до 0,61), для пронотума — в 4,2 раза (с 0,07 до 0,29), для элитр — доля редких вариаций сохранилась с тенденцией к возрастанию. На наш взгляд, такие изменения можно объяснить тем, что в процессе становления данной локальной популяции (подобная тенденция характерна и

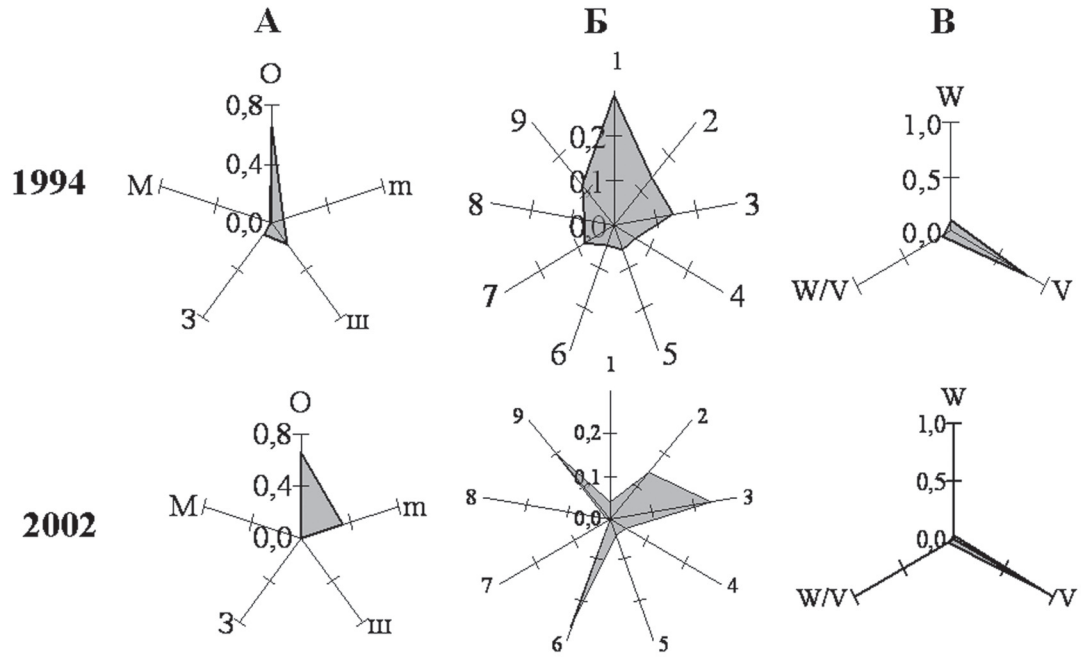

Рис. 1. Изменения фенетической структуры старомусинской локальной популяции колорадского жука за ряд лет. А — вариации фена темени, Б — пронотума, В — элитр. На осях полигонов отложены частоты вариаций соответствующего фена

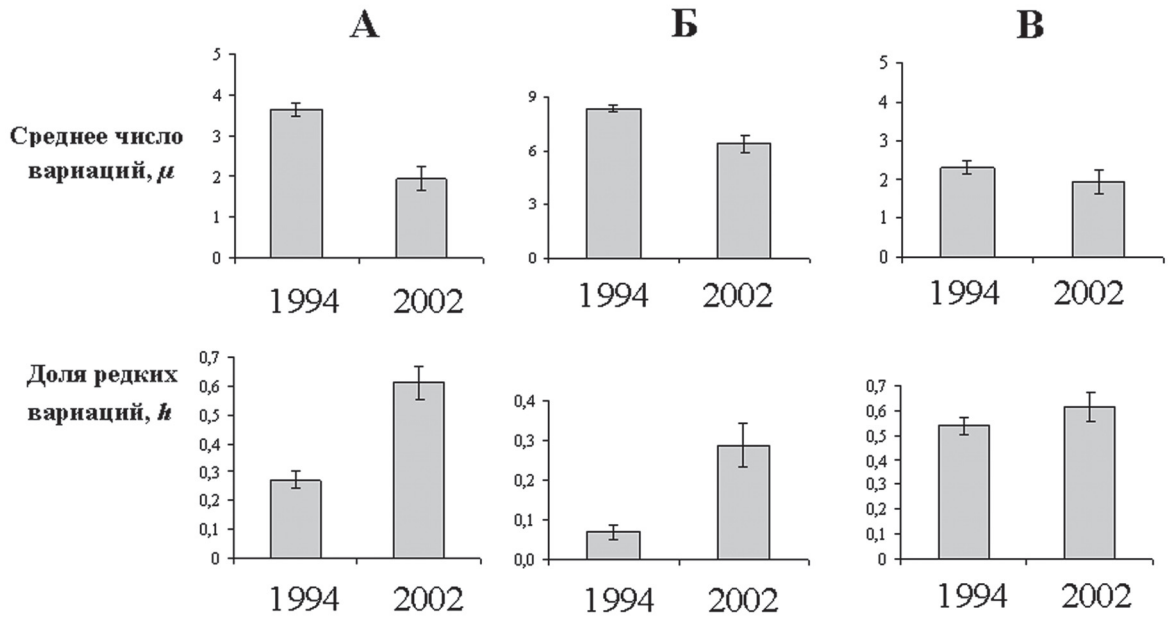

Рис. 2. Изменение уровня фенетического разнообразия старомусинской локальной популяции колорадского жука за ряд лет. А — вариации фена темени, Б — пронотума, В — элитр. Данные представлены с их выборочными ошибками s_μ и s_h

для выборок из других локальных популяций) снижение разнообразия происходило за счет перераспределения частот вариаций, в ходе которого часть вариаций, сформировавших ранее основу фенооблика популяции, переходит в разряд редких. А вариации, относящиеся к изначально редким, исчезают в результате их «вымывания» селективным отбором при инсектицидных обработках.

Как одну из гипотез, можно высказать предположение о том, что основное влияние на формирование фенетической структуры популяции колорадского жука на территории Южного Урала оказало «селективное» действие инсектицидов. При этом, в ходе «бессознательного отбора» в терминах Яблокова, Юсуфова (2004) происходит избирательное выживание особей, устойчивых к

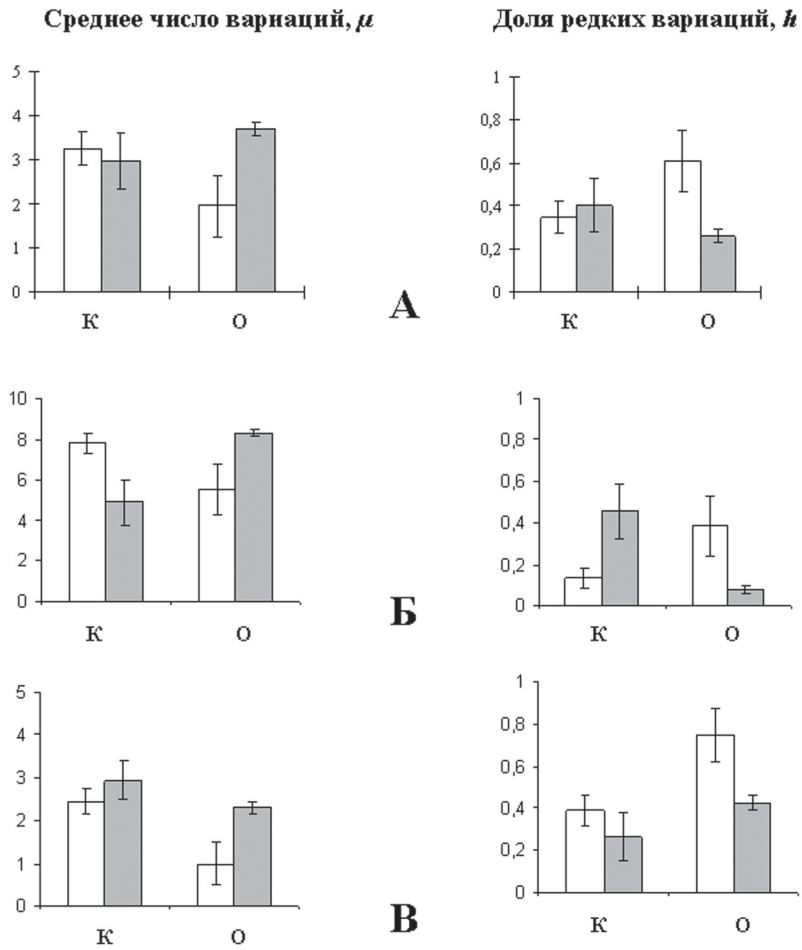

Рис. 3. Изменение уровня фенетического разнообразия в казангуловской локальной популяции колорадского жука по результатам токсикологического анализа в лабораторных экспериментах.
А — вариации фена темени, Б — пронотума, В — элитр. Светлые столбики — для выживших особей, серые — для погибших. К — контроль, О — опыт. Данные представлены с их выборочными ошибками s_μ и s_h

действию инсектицидов и, напротив, элиминация особей чувствительных, чьи генотипы маркируются определенными фенами рисунка. Ранее нами была отмечена однонаправленность возрастания уровня резистентности к инсектицидам и увеличения частот некоторых вариаций фенов в локальных популяциях колорадского жука в Башкортостане (Удалов, 2006; Benkovskaya et al., 2006). В частности, в выживших после токсикологических обработок выборках преобладали особи, маркированные вариациями пронотума «3», «6» и «9» (Беньковская и др., 2004, 2008а). Скорее всего, именно накоплением особей резистентных к инсектицидам фенотипов с данными вариациями объясняется двукратное увеличение их доли в выборке 2002 г. (рис. 1, Б). Подобные же процессы — увеличение доли вариаций фена рисунка пронотума «3», «6» и «9» — отмечены и для популяций колорадского жука в других частях ареала — Московской области (Рославцева, Еремина, 2005), Брянской (Олейников и др., 2006), Калининградской, Ростовской и Вологодской областях (Васильева и др., 2005).

Мы рассмотрели, как воздействие инсектицидов в лабораторных условиях влияет на изменение уровня разнообразия в выборках их казангуловской локальной популяции (Давлекановский район Башкортостана) колорадского жука.

На рисунке 3 показаны изменения уровней фенетического разнообразия колорадского жука в общих выборках и в выборках, выживших после обработок летальной концентрацией волатона в лабораторных экспериментах.

Статистическая значимость различий характерна только для изменений частот вариаций фена пронотума: при сравнении выживших в опыте с выжившими в контроле и при сравнении выживших в опыте с погибшими в опыте ($p < 0{,}001$). По результатам сравнения выборок по частотам фенов темени и элитр различия статистически не достоверны.

Отмечено снижение уровня фенетического полиморфизма (среднее число вариаций μ) в группе выживших после обработки жуков как при сравнении с контролем

(в 1,7 раза для фенов темени, в 1,5 раза для фенов пронотума и 2,3 раза для фенов элитр) так и при сравнении с погибшими после обработки (в 1,9 раза для фенов темени, в 1,4 раза для фенов пронотума и в 2,5 раза для фенов элитр).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами был проведен анализ различий в ряде локальных популяций колорадского жука на территории республики Башкортостан между данными фенетического анализа 1994 и 2002 годов. Были выявлены изменения фенетической структуры локальных популяций колорадского жука во времени. Отмечено в нативных популяциях и экспериментально подтверждено в лабораторных опытах снижение уровня фенетического полиморфизма (среднего числа вариаций) в результате многократных обработок инсектицидами. Это дает нам возможность считать, что изменения уровня полиморфизма в популяциях колорадского жука на Южном Урале в основном обусловлены именно этим антропогенным фактором.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена в рамках грантов, поддержанных Российским фондом фундаментальных исследований (проекты РФФИ № 09-04-00391-а и № 08-04-97015-р_поволжье_а). Авторы будут благодарны всем коллегам за возможность получить образцы колорадского жука из различных частей его ареала. Авторы благодарят рецензента за критический разбор нашей рукописи, за конструктивные и ценные замечания.

Литература

1. *Амирханов Д. В.,* 1995. Биолого-токсикологическое обоснование совершенствования химической защиты картофеля от колорадского жука на Южном Урале: Автореф. докт. дис. СПб, 48 с.
2. *Беньковская Г. В.,* 2007. Освоение новых пищевых ресурсов в популяциях колорадского жука // Материалы конференции «Современные проблемы биологической эволюции», Москва. С. 101–103.
3. *Беньковская Г. В., Удалов М. Б., Поскряков А. В. и др.,* 2004. Феногенетический полиморфизм колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say и его чувствительность к инсектицидам на территории Башкирии // Агрохимия. № 12. С. 23–28.
4. *Беньковская Г. В., Леонтьева Т. Л., Удалов М. Б.,* 2008а. Резистентность колорадского жука к инсектицидам на Южном Урале // Агрохимия. № 8. С. 55–59.
5. *Беньковская Г. В., Удалов М. Б., Хуснутдинова Э. К.,* 2008б. Генетическая основа и фенотипические проявления резистентности колорадского жука к фосфорорганическим инсектицидам // Генетика. Т. 44. № 5. С. 638–644.
6. *Васильева Т. И., Иванова Г. П., Иванов С. Г. и др.,* 2005. Изменения фенотипической структуры популяций колорадского жука от интенсивности применения инсектицидов // Материалы Второго Всероссийского съезда по защите растений «Фитосанитарное оздоровление экосистем», СПб. С. 14–15.
7. *Еремина И. В., Денисова И. А.,* 1987. Изменчивость некоторых признаков колорадского жука в Саратовской области. М., 1987. 13 с. Деп. ВИНИТИ 13. 0787, № 7712-В87.
8. *Животовский Л. А.,* 1991. Популяционная биометрия. М.: Наука. 271 с.
9. *Зелеев Р. М.,* 2002. Оценка полиморфизма рисунка переднеспинки и надкрылий колорадского жука, *Leptinotarsa decemlineata*, в окрестностях Казани // Зоологический журнал. Т. 81. № 3. С. 316–322.
10. *Климец Е. П.,* 1988. Выявление чувствительности колорадского жука к действию инсектицидов с помощью фенов // Фенетика природных популяций. Тез. докл. М.: Наука. С. 111–117.
11. *Климец Е. П.,* 1997. Дискретные вариации рисунка на дорсальной стороне тела колорадского жука *(Leptinotarsa decemlineata)* // Популяционная фенетика. М.: Наука. С. 45–58.
12. *Кохманюк Ф. С.,* 1981. Колорадский жук как модель микроэволюции // Природа. № 12. С. 86–87.
13. *Лакин Г. Ф.,* 1990. Биометрия. М.: Высшая школа. 352 с.
14. *Мигранов М. Г.,* 1994. Пиретроиды: отечественные аналоги и их токсикология. — Уфа: Принт. 101 с.
15. *Овчинникова Н. А., Климец Е. Н., Маркелов Г. В.,* 1984. Динамика генетической структуры популяции колорадского жука на территории Липецкой области // Генетика. Т. XX. № 1. С. 140–143.
16. *Овчинникова НА., Маркелов Г. В.,* 1982. Внутривидовая изменчивость колорадского жука в Липецкой области // Науч. докл. Высшей школы. Биол. науки. № 7. С. 63–67.
17. *Олейников А. В., Яковлева И. Н., Рославцева С. А. и др.,* 2006. Устойчивость к инсектицидам, фенетическая структура и активность ферментов в популяциях колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say из Брянской области // Агрохимия. № 3. С. 46–51.
18. Прогноз появления и распространения вредителей и болезней сельскохозяйственных культур в Башкирской АССР в 1978 году и меры борьбы с ними. 1978 / под ред. Л. А. Савилова. Уфа: Башкирское книжное издательство. 94 с.
19. *Рославцева С. А., Еремина О. Ю.,* 2005. Резистентность к пиретроидам и фенотипический анализ популяций колорадского жука из Можайского района Московской области // Материалы Второго Всероссийского съезда по защите растений. «Фитосанитарное оздоровление экосистем», СПб. С. 57–58.

20. *Рославцева С. А.,* 2009. Резистентность к инсектицидам в популяциях колорадского жука // Агрохимия. № 1. С. 87–92.
21. *Удалов М. Б., Поскряков А. В., Беньковская Г. В. и др.,* 2003. Молекулярно-биологические методы мониторинга резистентности к инсектоакарицидам в популяциях членистоногих // Агрохимия. № 6. С. 81–88.
22. *Удалов М. Б.,* 2006. Структура популяции колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say на Южном Урале: Автореф. канд. дис. Уфа. 24 с.
23. *Удалов М. Б., Беньковская, Г. В., Поскряков А. В. и др.,* 2009. Полиморфизм ДНК в изучении популяций членистоногих // Успехи современной биологии. Т. 129. №. 1. С. 51–57.
24. *Ушатинская Р. С.,* 1981. Колорадский картофельный жук. Филогения, морфология, физиология, экология, адаптация, естественные враги. — М.: Наука. 377 с.
25. *Фасулати С. Р.,* 1985. Полиморфизм и популяционная структура колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say в Европейской части СССР // Экология. № 6. С. 50–56.
26. *Фасулати С. Р., Вилкова Н. А., Иващенко Л. С.,* 1994. Видовые и внутриродовые особенности пищевых связей колорадского жука с растениями семейства *Solanacea* // Комуникация насекомых. Материалы международного симпозиума, Харьков. С. 109–112.
27. *Фасулати С. Р., Н. А. Карасева Н. А.,* 1998. Устойчивость овощных пасленовых растений к колорадскому жуку и принципы ее оценки в связи с внутривидовой изменчивостью вредителя // АгроXXI. №2. С. 14–16.
28. *Фасулати С. Р.,* 2002. Территориальное расселение колорадского жука в северных районах картофелеводства // Экологические аспекты интенсификации сельскохозяйственного производства. Мат-лы международной научно-практической конференции, Пенза. С. 205–207.
29. *Яблоков А. В., Юсуфов А. Г.,* 2004. Эволюционное учение. Учеб. для биол. спец. вузов. — М.: Высш. шк. 310 с.
30. *Benkovskaya G. V., Udalov M. B., Nikolenko A. G. et al.,* 2006. Temporal and toxicological dynamics in the cover spot patterns of the Colorado Potato Beetle in South Ural // Resistant Pest Management Newsletter. Vol. 15. N. 2. P. 13–15.
31. *Tower W. L.,* 1906. An investigation of evolution in Chrysomelid beetles of the genus Leptinotarsa. Wash.: Publ. Carnegie Inst., 320 p.

CHANGE OF POLYMORPHISM LEVEL IN COLORADO POTATO BEETLE POPULATIONS IN THE SOUTHERN URALS

Udalov M. B., Benkovskaya G. V.

❀ **SUMMARY: Data has been presented by the changing of phenetic structure of Colorado potato beetle populations in the Southern Urals (territory of Bashkortostan). The reduction of phenetic polymorphism level during the period of 1994–2002 has been noted. The results of laboratory toxicological experiments allow considering the selective effects of insecticides as one of main factors of intrapopulation polymorphism level decreasing.**

❀ **KEY WORDS:** Colorado potato beetle; *Leptinotarsa decemlineata* Say; population dynamics; population fenetics; population genetics; polymorphism; South Urals.

❀ Информация об авторах

Удалов Максим Борисович — к. б. н., научный сотрудник лаборатории физиологической генетики, член Русского Энтомологического Общества.
Учреждение РАН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, отдел геномики, лаборатория физиологической генетики.
450054 Уфа, просп. Октября, 71, Россия.
E-mail: udalov-m@yandex.ru

Udalov Maxim Borisovich — PhD.
Institute of biochemistry and genetics UNC the Russian Academy of Sciences, laboratory of physiological genetics.
450054 Ufa, avenue of October, 71, Russia.
E-mail: udalov-m@yandex.ru

Беньковская Галина Васильевна — д. б. н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории физиологической генетики, член Русского Энтомологического Общества.
Учреждение РАН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, отдел геномики, лаборатория физиологической генетики.
450054 Уфа, просп. Октября, 71, Россия.
E-mail: bengal2@yandex.ru

Benkovskaya Galina Vasilevna — doctor of biological science, associate professor .
Institute of biochemistry and genetics UNC the Russian Academy of Sciences, laboratory of physiological genetics.
450054 Ufa, avenue of October, 71, Russia.
E-mail: bengal2@yandex.ru.

УДК [574 : 539.163 + 615.916.1 : 546.16] + 591.1 + 575.1

© А. А. Москалев,
О. А. Малышева

Институт биологии Коми
НЦ УрО РАН, Сыктывкар

РОЛЬ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *dFOXO*, *dSIR2* И *HSP70* В ИЗМЕНЕНИИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ОСВЕЩЕНИЯ

❀ **Исследована роль генов стрессоустойчивости *(dFOXO, dSir2, Hsp70)* в регуляции продолжительности жизни дрозофил в ответ на изменение режимов освещения. Выявлен FOXO-зависимый механизм увеличения продолжительности жизни при содержании особей дрозофил в темноте. Различия ПЖ в темноте и на свету у мутантов-гомозигот *FOXO* в трех случаях из четырех не наблюдались. Обнаружено, что особи-гомозиготы с мутацией в гене *dSir2* имеют более значительную разницу продолжительности жизни в темноте и на свету по сравнению с особями дикого генотипа и гетерозиготной линией. У линий с делециями генов *Hsp70* также наблюдается тенденция к снижению продолжительности жизни на свету. Представлены доказательства в пользу существования двух механизмов влияния светового режима на продолжительность жизни животных: интенсификация метаболизма при содержании на свету и нейроэндокринно обусловленное увеличение продолжительности жизни в условиях затемнения.**

❀ **Ключевые слова**: продолжительность жизни; *Drosophila melanogaster*; световой режим; транскрипционный фактор *FOXO*; сиртуины; белки теплового шока.

Поступила в редакцию 03.06.2010.
Принята к публикации 13.07.2010.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно исследуется влияние на продолжительность жизни **(ПЖ)** различных экологических факторов — температуры (Helfand, Rogina, 2003; Huang et al., 2004), качества пищи (Helfand, Rogina 2003; Cheng et al., 2005; Partridge et al., 2005), ионизирующей радиации (Москалев, 2004, 2008; Sasaki, Fukuda, 2006; Moskalev, 2007; Moskalev et al., 2008), ведется поиск генетических механизмов их влияния на скорость старения организма. В то же время работы, касающиеся проблем генетического контроля влияния на ПЖ различных режимов освещения, крайне немногочисленны.

Известно, что искусственное увеличение длины светового дня уменьшает ПЖ *Drosophila melanogaster* и мышей, тогда как его укорочение увеличивает ее (Москалев и др., 2006; Анисимов, 2008; Виноградова и др., 2007, 2008; Москалев и др., 2008; Москалев, Малышева, 2009; Massie, Whitney, 1991; Massie, Aiello, Williams, 1993; Sheeba et al, 2000; Majercak, 2002; Anisimov et al., 2004; Vinogradova et al., 2009). Однако механизмы влияния света на долгожительство изучены слабо. Существует несколько основных предположений о механизмах влияния измененных условий освещения на ПЖ: интенсификация метаболизма (Massie, Whitney, 1991; Sheeba et al., 2002; Helfand Rogina 2003), увеличение плодовитости (Sheeba et al, 2000; Sheeba et al, 2002), нарушение циркадных ритмов (Hardeland et al., 2003; Kondratov et al., 2007; Antoch, 2008). Согласно главенствующей точке зрения, увеличение длины светового дня может приводить к более высокому уровню метаболизма вследствие интенсификации двигательной активности и изменения температуры тела дрозофил (Sheeba et al., 2002). Свободнорадикальная теория старения (Harman, 1956) постулирует, что интенсификация метаболизма ведет к дополнительной продукции свободных радикалов, повреждающих митохондриальную и ядерную ДНК, мембраны и белки клетки (Анисимов, 1999, 2000), что обусловливает ускоренное старение и укорочение продолжительности жизни. В предыдущих исследованиях нами было показано, что снижение активности гена фермента Cu/Zn супероксиддисмутазы приводит к значительному увеличению разницы значений ПЖ дрозофилы в темноте и на свету по сравнению с линией дикого типа (Москалев и др., 2006), а добавление в корм антиоксиданта мелатонина снижает эти различия (Москалев и др., 2008).

В настоящее время установлено, что в регуляции оксидативного стресс-ответа и продолжительности жизни ключевая роль принадлежит белкам семейства сиртуинов (Guarente, Kenyon, 2000; Fabrizio et al., 2005; Berdichevsky et al., 2006; Xiangzhong et al., 2007). Деацетилируя гистоны и различные транскрипционные факторы (p53, *FOXO*), сиртуины приводят к активации экспрессии генов стресс-ответа, ингибированию апоптоза, способствуя выживаемости клетки и увеличению продолжительности жизни организма (Tanno et al., 2007; Niedernhofer et al., 2008). Роль сиртуинов в изменении

ПЖ при влиянии разных режимов освещения прежде не изучалась. В данной работе мы исследовали ПЖ у линий гетеро- и гомозиготных по делеции гена *dSir2* в условиях стандартного освещения и затемнения. Нами показано, что особи-гомозиготы с мутацией в гене *dSir2* имеют более значительную разницу в ПЖ в темноте и на свету по сравнению с носителями дикого генотипа и гетерозиготной линией.

Не менее важное значение в реакциях стресс-ответа клетки имеют белки теплового шока (Hsp), участвующие в процессах репарации и протеолиза поврежденных белков (Панасенко, 2003; Coffer, 2003; Hunt et al., 2004; Arya et al., 2007). Кроме того, более высокая активность Hsps сопряжена с долгожительством у различных модельных животных (Morrow et al., 2004; Kimura et al., 2006). Было показано, что в отсутствии функциональной копии гена *Hsp70* исчезает адаптивный ответ к воздействию индуктора свободных радикалов параквата (Турышева и др., 2008; Moskalev, Shaposhnikov, Turysheva, 2008). Экспрессия гена *Hsp70* усиливается при окислительных повреждениях (Guo et al., 2007; Soti, Csermely, 2007), что способствует улучшению окислительно-восстановительного состояния клетки и увеличению активности антиокислительных ферментов (глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы) (Guo et al., 2007). Кроме того, в экспериментах у мутантов дрозофилы по генам каталазы и Cu, Zn-Sod при старении уменьшалось время индукции гена *Hsp70*, что свидетельствует о его участии в ответе на оксидативный стресс (Landis et al., 2004). Мы предположили, что делеции генов семейства *Hsp70* у линий дрозофил, содержащихся при 12-часовом режиме освещения, могут способствовать снижению ПЖ по сравнению с затемнением. Нами установлено, что у линий с мутациями в генах белков теплового шока наблюдается тенденция к уменьшению продолжительности жизни на свету по сравнению с линией дикого типа.

Перечисленные механизмы рассматривают лишь эффекты, связанные с повреждающим воздействием дополнительного освещения. Нельзя исключить и другой механизм, при котором уменьшение длины светового дня (содержание в условиях затемнения) как мягкий стресс-фактор может дополнительно стимулировать защитные системы организма, не оказывая при этом повреждающего действия, что приводит к увеличению ПЖ при содержании в темноте (рис. 1). Согласно предложенной нами нейроэндокринной гипотезе влияния света на ПЖ животных (Москалев, Малышева, 2009), в ответ на укорочение длины светового дня, которое в естественных условиях местообитаний предвещает скорое наступление холодов, у животных подавляется активность инсулин/IGF-1 сигнального механизма, но деблокируются процессы стресс-ответа с участием транскрипционного фактора FOXO. Известно, что транскрипционные факторы семейства FOXO играют важную роль в регуляции стрессоустойчивости и ПЖ животных (Boudewijn et al., 2003; Lee et al., 2003; Kramer et al., 2003; Lam et al., 2006). При стресс-реакции *FOXO* запускает экспрессию генов ферментов детоксикации свободных радикалов и репарации ДНК, белков теплового шока, ингибиторов циклин-зависимых киназ (Giannakou, Partridge, 2004; Huang, Tindall, 2006). Клетка становится более устойчивой к стрессам, лучше справляется со спонтанными повреждениями, что снижает скорость старения организма в целом. Согласно литературным данным, постоянная сверхэкспрессия *dFOXO* в жировом теле взрослой особи дрозофилы снижает темп смертности, увеличивает устойчивость к индуктору свободных радикалов параквату и увеличивает ПЖ мух (Giannakou, Partridge 2004; Giannakou et al., 2007), тогда как нарушение в работе *dFOXO* повышает чувствительность к оксидативному стрессу и уменьшает их ПЖ (Junger et al., 2003). Мы изучили ПЖ особей дрозофилы, гомозиготных по гипоморфным аллелям гена *FOXO* при разных условиях освещения. Нами показан *FOXO*-зависимый механизм увеличения ПЖ дрозофил в темноте.

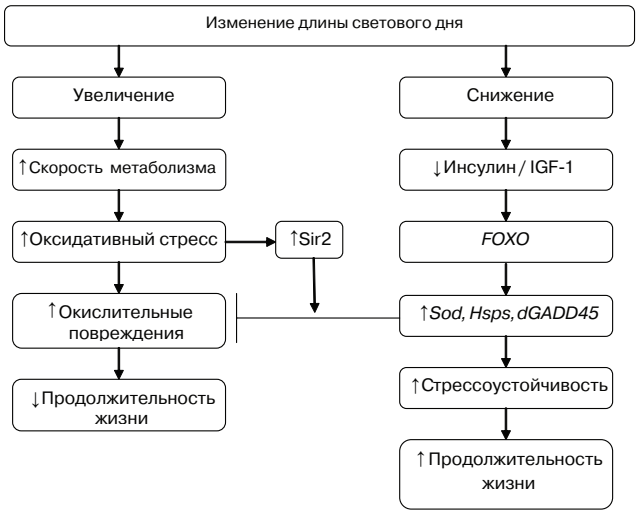

Рис. 1. Механизмы влияния изменения длины светового дня на продолжительность жизни дрозофилы. Обозначения: → — индукция; ┤ — ингибирование; ↑ — увеличение; ↓ — снижение

Таким образом, цель данной работы состояла в изучении роли генов транскрипционного фактора FOXO, *dSir2* и *Hsp70* в изменении продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* при различных режимах освещения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Лабораторные линии *Drosophila melanogaster*:

1) линия дикого типа *Canton-S*;
2) линия дикого типа w^{1118}, которая в качестве маркера гомозиготности несет на хромосоме X рецессивную мутацию гена *white*;

Таблица 1

Параметры продолжительности жизни самцов и самок лабораторных линий дрозофилы *w*[1118], *Sir2*[17]/+ и *Sir2*[2A-7-11] при различных режимах освещения

Линия	Пол	Освещение, ч	МеПЖ	90%	min	max	MRDT	α	R	N
w[1118]	♂♂	12	36,0	44	9	50	5,9	0,1177	0,0012	237
		0	43,0*	51*	9	68	8,7	0,0796	0,0021	270
	♀♀	12	43,0	56	15	65	7,1	0,0989	0,0008	259
		0	50,0*	66*	9	67	7,7	0,0903	0,0006	242
Sir2[17]/+	♂♂	12	44,0	55	4	69	8,7	0,0797	0,0019	188
		0	50,0*	66**	9	78	11,6	0,0620	0,0021	214
	♀♀	12	45,0	64	9	71	9,0	0,0769	0,0015	227
		0	45,0	61	9	69	8,1	0,0857	0,0010	176
Sir2[2A-7-11]	♂♂	12	29,0	44	8	44	8,7	0,0840	0,0049	167
		0	43,0*	66*	9	69	11,7	0,0593	0,0039	185
	♀♀	12	29,0	44	8	54	6,8	0,1016	0,0027	171
		0	43,0*	58***	15	63	7,4	0,0941	0,0011	213

Различия между 0 ч и 12 ч статистически значимы: * — $p < 0{,}001$; ** — $p < 0{,}004$; *** — $p < 0{,}05$, Здесь и далее: МеПЖ — медианная продолжительность жизни; 90 % — время жизни 90 % когорты; min и max — минимальная и максимальная продолжительность жизни в выборке; MRDT — время удвоения интенсивности смертности; α и R —параметры уравнения Гомперца; N — количество особей в выборке; ♂♂ — самцы; ♀♀ — самки

3) линия ***Sir2*[17]/+** (генотип *w*[1118]; *Sir2*[17]/*SM6a*) содержит в гетерозиготе гипоморфную аллель гена *Sir2*;
4) линия ***Sir2*[2A-7-11]** (w[1118]; Sir2[2A-7-11]) несет в гомозиготе делецию гена *Sir2*;
5) линия ***Df(3R)Hsp70A, Df(3R)Hsp70B*** (*w*[1118]; *Df(3R) Hsp70A, Df(3R)Hsp70B)* содержит в гомозиготе делеции нескольких генов семейства *Hsp70* (*Hsp70Aa, Hsp70Ab, Hsp70Ba, Hsp70Bb, Hsp70Bbb* и *Hsp70Bc*);
6) линия ***Df(3R)Hsp70A*** (*w*[1118]; *Df(3R)Hsp70A)* имеет делеции генов *Hsp70A* (*Hsp70Aa* и *Hsp70Ab*);
7) линия ***FOXO*[21]** (*y, w; Sp/CyO; dFOXO*[21]*/TM6B Tb, Hu)* содержит в гомозиготе гипоморфную аллель гена транскрипционного фактора FOXO;
8) линия *FOXO*[25] *(y, w; FRT 82 dFOXO*[25] */TM6B Tb, Hu)* содержит в гомозиготе гипоморфную аллель гена транскрипционного фактора *FOXO*.

Для получения особей с пониженной активностью гена *FOXO* (с генотипом *FOXO*[21]/*FOXO*[25]) производили скрещивание родительских линий *FOXO*[21] и *FOXO*[25].

Линии *Drosophila melanogaster* любезно предоставлены коллекцией Bloomington Drosophila Stock Center (университет штата Индиана, США) и Dr. Ernst Hafen (Institute for Molecular Systems Biology, Switzerland).

Условия эксперимента

Культивирование родительских линий проводили в термостате при температуре 25°C и стандартном 12 ч режиме освещения, в баночках 100 мл, содержащих 25 мл дрожжевой питательной среды (Ashburner, 1989). После появления имаго в течение суток производили отбор необходимого количества особей (50 штук на баночку), предварительно наркотизировав их эфиром. Самцы и самки содержались раздельно. Общее количество баночек каждой линии было разделено на несколько групп. Одну часть индивидуумов каждой линии подвергали воздействию 12 ч освещения при интенсивности 120–130 LX, другая часть находилась в постоянной темноте на протяжении всей жизни. Подсчет числа умерших мух проводили ежедневно (за исключением субботы и воскресенья). Выживших мух еженедельно перемещали на свежую среду.

Статистическая оценка продолжительности жизни

Известно, что распределение продолжительности жизни не подчиняется нормальному закону (Гаврилов, Гаврилова, 1986). Ненормальность распределения исключает использование параметрических критериев (Лакин, 1990). Поэтому для оценки достоверности различий по продолжительности жизни в опыте и контроле применяли непараметрический критерии Гехана-Бреслоу-Вилкоксона (для оценки различий медианной продолжительности жизни, МеПЖ) и Колмогорова–Смирнова (сравнение кривых выживаемости) (Ермаков, 1987). Дополнительно оценивали и другие характеристики продолжительности жизни: минимальную, максимальную продолжительность жизни когорты (смертность 100 % всех особей) и время 90 %-й гибели. Последний показатель использовался по причине того, что он менее зависим от случайных факторов, чем максимальная продолжительность жизни. Для оценки статистической значимости различий 90 %-й гибели применяли метод Ванг–Аллисона (Wang–Allison test)

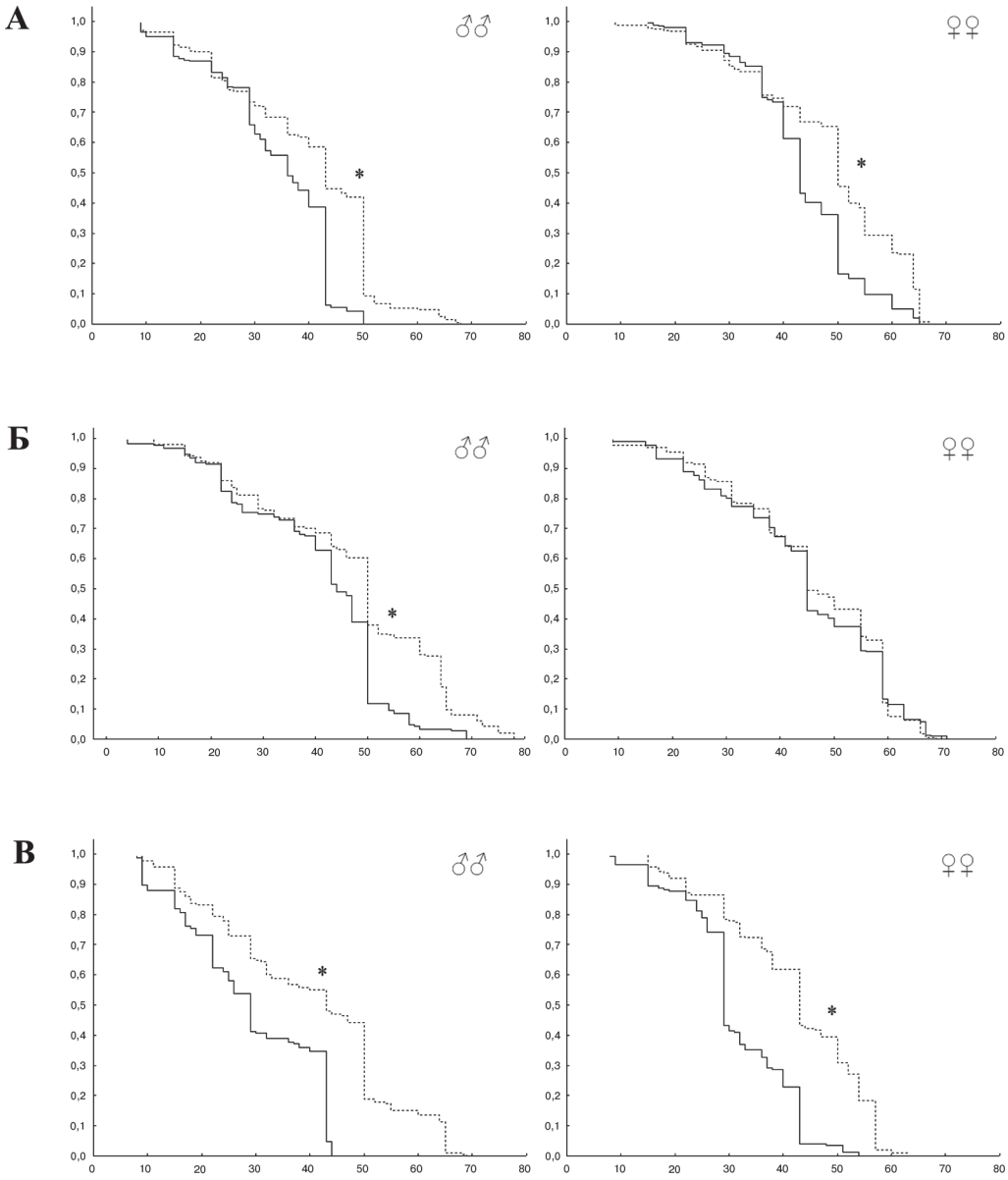

Рис. 2. Кривые выживаемости самцов (♂♂) и самок (♀♀) дрозофилы линий w^{1118} (А), $Sir2^{17}/+$ (Б) и $Sir2^{2A\text{-}7\text{-}11}$ (В)
Обозначения: ——— 12 ч, – – – – 0 ч, * — различия достоверны при $p < 0{,}001$ (по критерию Колмогорова–Смирнова)

(Wang et al., 2004). Функции дожития оценивали с помощью процедуры Каплана–Мейера и представляли в виде кривых дожития (Крутько, Славин, Смирнова, 2002). Для этой цели была применена программа Statistica 6.1 (Statsoft, США).

Для анализа скорости старения в экспериментальной популяции оценивали параметры смертности α и R из уравнения Гомпертца $\mu(x) = Re^{\alpha x}$ и время удвоения интенсивности смертности (MRDT) по формуле $MRDT = \ln 2/\alpha$. Достоверность отличий параметра α анализировали с использованием метода максимального правдоподобия (Pletcher, 1999) по критерию Хи-квадрат в программе Winmodest, любезно предоставленной С. Плетчером (Институт Макса–Планка).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В одном из экспериментов проводили анализ влияния различных режимов освещения у линий, гомозиготных и гетерозиготных по мутации гена *dSir2* в сравнении с линией дикого типа w^{1118} (табл. 1). При содержании особей контрольной линии дикого типа w^{1118} в условиях постоянного затемнения наблюдали достоверное ($p < 0{,}001$) увеличение МеПЖ (на 17 % у самцов и на 3 % у самок) и времени 90 %-гибели особей (на 14 % у самцов и на 15 % у самок) по сравнению с 12-ти часовым режимом освещения. Также в темноте происходило увеличение времени удвоения интенсивности смертности (MRDT) и снижение угла наклона

Таблица 2

Параметры продолжительности жизни самцов и самок лабораторных линий дрозофилы *Canton-S, Df(3R)Hsp70A, Df(3R)Hsp70B* и *Df(3R)Hsp70A* при различных режимах

Линия	Пол	Освещение, ч	МеПЖ	90%	min	max	MRDT	α	R	N
Canton-S	♂♂	12	52,0	60	10	72	6,3	0,1094	0,0003	248
		0	52,0	67*	10	80	7,1	0,0971	0,0003	236
	♀♀	12	59,0	67	11	73	5,5	0,1266	0,0001	250
		0	59,0	70**	10	84	5,7	0,1208	0,0001	220
Df(3R) Hsp70, Df(3R) Hsp70B	♂♂	12	24,0	32	5	49	5,5	0,1255	0,0038	292
		0	31,0*	45*	10	57	7,2	0,0967	0,0034	259
	♀♀	12	38,0	49	4	59	8,0	0,0866	0,0031	210
		0	38,0	53	4	59	8,7	0,0799	0,0028	246
Df(3R) Hsp70A	♂♂	12	44,0	56	5	59	8,3	0,0835	0,0018	254
		0	52,0*	60*	10	66	7,1	0,0971	0,0006	255
	♀♀	12	52,0	62	10	68	6,9	0,1002	0,0005	241
		0	52,0	69*	10	73	8,6	0,0803	0,0008	261
Различия между 0 и 12 ч статистически значимы: * — $p < 0,001$; ** — $p < 0,004$.										

траектории смертности α на 32 % у самцов ($p < 0,001$ по критерию Хи-квадрат) и на 9 % у самок. Кривые выживаемости (рис. 2А) достоверно различаются как у самцов, так и у самок ($p < 0,001$ по критерию Колмогорова–Смирнова). У самцов гетерозиготной по гипоморфной аллели гена *dSir2* линии $Sir2^{17}/+$, также как и у контрольной линии, в темноте происходило достоверное ($p < 0,001$) увеличение МеПЖ (на 12 %), времени 90%-й гибели особей (на 17 %, $p < 0,004$), MRDT, а параметр α уравнения Гомпертца в темноте уменьшился на 22 % ($p < 0,007$ по критерию Хи-квадрат). У самок гетерозиготной линии $Sir2^{17}/+$ в темноте наблюдалось незначительное снижение времени 90 %-гибели особей (на 5 %), MRDT, медиана не изменилась, а значение параметра α увеличилось на 10 %. Кривые выживаемости в темноте и на свету достоверно различались лишь у самцов ($p < 0,001$) (рис. 2Б). В то же время у особей гомозиготной линии $Sir2^{2A-7-11}$ с делецией гена *dSir2* мы наблюдали более значительную разницу между ПЖ в темноте и на свету по сравнению с контрольной и гетерозиготной линиями. Так, МеПЖ в темноте достоверно ($p < 0,001$) возросла на 33 % как у самцов, так и у самок, время 90%-й гибели особей у самцов увеличилось на 33 % ($p < 0,001$), у самок — на 24 % ($p < 0,05$). Также в темноте наблюдали увеличение MRDT и снижение параметра α на 29 % у самцов ($p < 0,003$ по критерию Хи-квадрат) и на 7 % у самок (табл. 1). Кривые выживаемости особей, содержащихся в темноте и на свету, достоверно различаются как у самцов, так и у самок ($p < 0,001$ по критерию Колмогорова–Смирнова) (рис. 2В).

В следующем эксперименте исследовали влияние делеций генов семейства *Hsp70* на изменение продолжительности жизни при разных режимах освещения в сравнении с реакциями у линии дикого типа *Canton-S*. В данном варианте эксперимента при содержании особей линии дикого типа *Canton-S* в условиях постоянной темноты МеПЖ не изменилась у обоих полов, однако достоверно увеличилось время 90%-й гибели особей (на 10 % при $p < 0,001$ у самцов и на 4 % при $p < 0,004$ — у самок), MRDT, тогда как значение параметра α уравнения Гомпертца в темноте уменьшилось на 11 % у самцов и на 7 % у самок (табл. 2). Кривые выживаемости в темноте и на свету достоверно различались как у самцов ($p < 0,001$), так и у самок ($p < 0,05$ по критерию Колмогорова-Смирнова) (рис. 3А). У линий с мутациями в генах семейства *Hsp70 (Df(3R)Hsp70A, Df(3R)Hsp70B; Df(3R)Hsp70A)* более выражено, чем у линии дикого типа Canton-S, наблюдали тенденцию к увеличению параметров ПЖ в темноте по сравнению с 12 ч режимом освещения. В частности, у особей линии *Df(3R)Hsp70A, Df(3R)Hsp70B* в темноте достоверно ($p < 0,001$) увеличилась МеПЖ (на 23 % у самцов, у самок не изменилась), время 90%-й гибели особей (на 29 % у самцов при $p < 0,001$, и на 8 % у самок), MRDT, в то же время значение параметра α в темноте у самцов уменьшилось на 23 % ($p < 0,001$ по критерию Хи-квадрат), а у самок — на 8 % (табл. 2). Кривые выживаемости самцов и самок исследуемых линий достоверно различались ($p < 0,001$ по критерию Колмогорова–Смирнова) (рис. 3Б). У особей другой гомозиготной линии *Df(3R)Hsp70A* в темноте МеПЖ увеличилась на 15 % у самцов ($p < 0,001$), у самок не изменилась, время 90 %-й гибели особей увеличилось на 7 % у самцов и на 10 % у самок. При этом у самцов в темноте снижается MRDT и увеличивается значение параметра α уравнения Гомпертца (на 14 %). У самок MRDT увеличивается, а параметр α уменьшается на 20 % ($p < 0,004$ по критерию Хи-квадрат) (табл. 2).

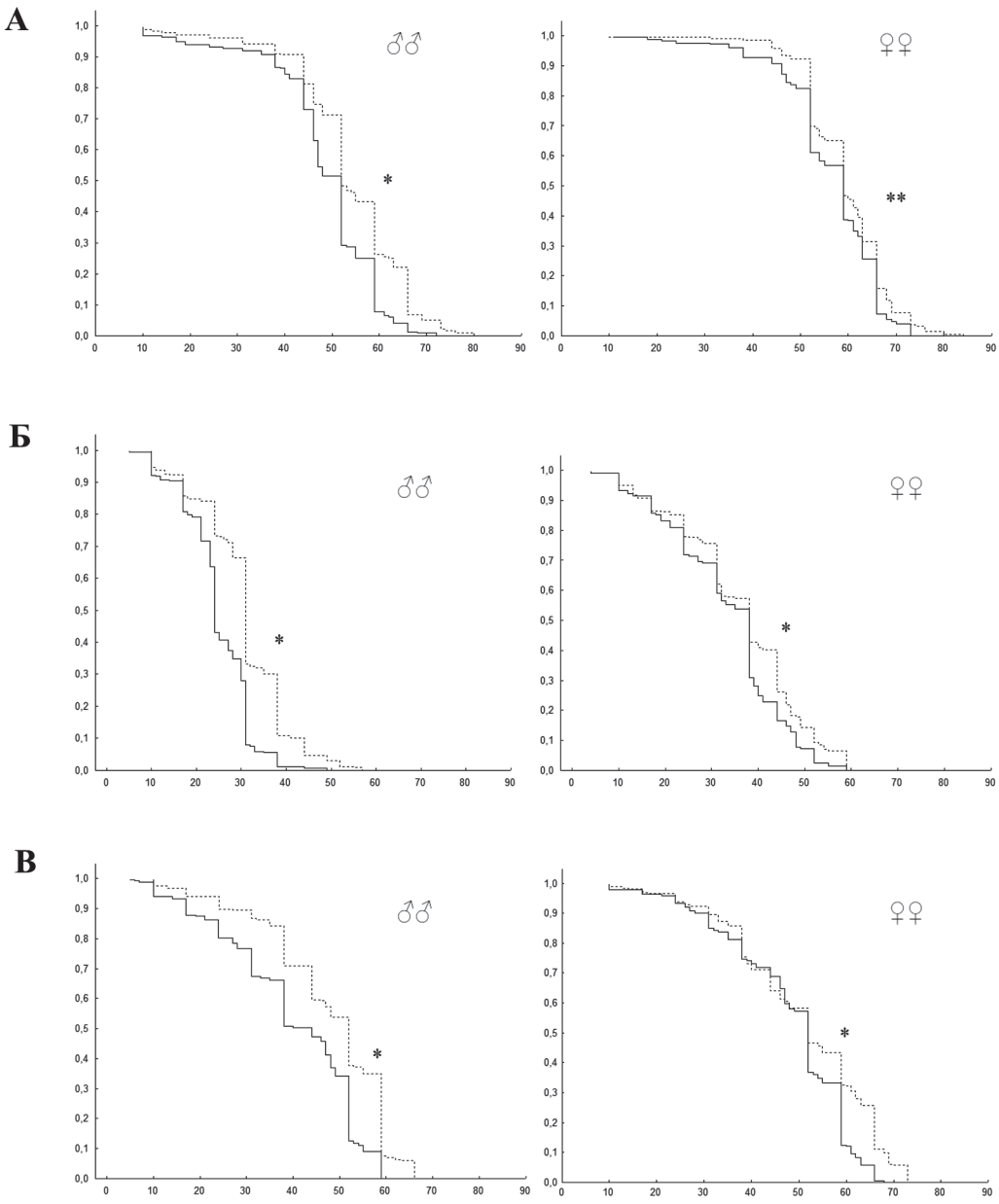

Рис. 3. Кривые выживаемости самцов (♂♂) и самок (♀♀) дрозофилы линий *Canton-S* (А), *Df(3R)Hsp70A, Df(3R)Hsp70B* (Б) и *Df(3R)Hsp70A* (В)
Обозначения: ——— 12 ч, – – – – 0 ч, различия достоверны (по критерию Колмогорова–Смирнова): * — $p<0{,}001$, ** — $p<0{,}05$

Кривые выживаемости самцов и самок достоверно различаются ($p<0{,}001$) (рис. 3В).

В последнем эксперименте сравнивали эффекты влияния гипоморфоных мутаций гена транскрипционного фактора FOXO в гомозиготе с эффектами разных световых режимов у гетерозигот и линии дикого типа *Canton-S*. В данном эксперименте при содержании особей *Canton-S* в условиях постоянной темноты в двух независимых повторностях эксперимента наблюдали достоверное ($p<0{,}001$) увеличение МеПЖ самцов (на 26–35 %) и самок (на 5–19 %), времени 90 %-ной гибели особей (при $p<0{,}001$) на 7–25 % у самцов и на 6 % в одной из повторностей у самок. Значение параметра α при содержании в темноте у самцов и самок, соответственно, в одной повторности увеличивается на 44 % ($p<0{,}001$) и 24 % ($p<0{,}002$ по критерию Хи-квадрат), а в другой уменьшается на 28 % ($p<0{,}001$ по критерию Хи-квадрат) и 8 %. Аналогично изменяется и значение MRDT (табл. 2). Кривые выживаемости достоверно различаются как у самцов, так и у самок в обеих экспериментальных повторностях ($p<0{,}001$ по критерию Колмогорова–Смирнова) (рис. 4–5А). У гетерозиготных по гену FOXO

Таблица 3

Параметры продолжительности жизни самцов и самок лабораторных линий дрозофилы *Canton-S*, *FOXO* ^{21}, *FOXO* ^{25} и *FOXO* ^{21}/ *FOXO* ^{25} при различных режимах освещения

Линия	Пол	Освещение, ч	МеПЖ	90%	min	max	MRDT	α	R	N
Повторность 1										
Canton-S	♂♂	12	33,0	52	8	54	7,5	0,0922	0,0024	203
		0	51,0*	56*	8	58	4,2	0,1636	0,0004	203
	♀♀	12	35,0	52	8	58	8,6	0,0802	0,0028	206
		0	43,0*	52	8	68	6,6	0,1052	0,0007	201
FOXO ^{21}	♂♂	12	50,0	55	8	71	6,6	0,1047	0,0007	273
		0	52,0*	67*	15	93	12,4	0,0554	0,0025	196
	♀♀	12	51,0	67	10	87	11,6	0,0597	0,0024	206
		0	54,0*	80**	11	99	11,3	0,0610	0,0013	195
FOXO ^{25}	♂♂	12	37,0	55	4	58	7,9	0,0869	0,0022	229
		0	44,0*	65*	8	87	9,4	0,0735	0,0014	212
	♀♀	12	36,0	58	4	80	11,6	0,0595	0,0045	207
		0	57,0*	65	8	79	9,9	0,0700	0,0015	213
FOXO ^{21}/ *FOXO* ^{25}	♂♂	12	22,0	36	4	50	7,2	0,0956	0,0092	201
		0	24,0*	52*	4	64	10,6	0,0651	0,0068	267
	♀♀	12	34,0	52	8	52	9,1	0,0761	0,0044	272
		0	38,0****	53***	8	64	11,1	0,0623	0,0052	218
Повторность 2										
Canton-S	♂♂	12	37,0	49	9	61	5,7	0,1219	0,0007	211
		0	50,0*	65*	6	77	7,9	0,0877	0,0007	236
	♀♀	12	57,0	65	4	78	4,9	0,1424	0,0004	282
		0	60,0*	69*	8	78	5,3	0,1310	0,0004	288
FOXO ^{21}	♂♂	12	46,0	68	6	96	12,2	0,0569	0,0028	227
		0	60,0*	75	9	86**	8,6	0,0803	0,0005	168
	♀♀	12	53,0	86	6	95	15,2	0 ,0456	0,0025	124
		0	71,0*	89	15	103**	9,5	0,0728	0,0003	350
FOXO ^{25}	♂♂	12	47,0	58	9	71	7,8	0,0893	0,0011	195
		0	50,0*	69	8	77*	8,3	0,0836	0,0006	195
	♀♀	12	39,0	69	8	81	15,4	0,0451	0,0061	146
		0	50,0*	79	8	89***	17,3	0,0401	0,0043	190
FOXO ^{21}/ *FOXO* ^{25}	♂♂	12	21,0	30	6	36	6,5	0,1067	0,0095	210
		0	22,0	37	8	50*	7,5	0,0918	0,0010	237
	♀♀	12	29,0	40	6	47	6,3	0,1087	0,0036	237
		0	29,0	48	8	50*	8,7	0,0798	0,0054	198
Различия между 0 и 12 ч статистически значимы:* — $p < 0,001$; ** — $p < 0,005$; *** — $p < 0,02$; **** — $p < 0,05$.										

родительских линий (*FOXO*^{25} и *FOXO*^{21}) наблюдали более значительное увеличение исследуемых параметров ПЖ как в темноте, так и на свету по сравнению с контрольной линией дикого типа *Canton-S*. Так у особей линии *FOXO*^{21} в условиях постоянной темноты в двух независимых повторностях эксперимента наблюдали достоверное ($p < 0,001$) увеличение МеПЖ (на 4 % у самцов и 6–25 % у самок), времени 90%-й гибели особей (на 15–18 % у самцов при $p < 0,001$ и на 4–16 % у самок при $p < 0,005$). Значение параметра α уравнения Гомпертца в темноте в одной из повторностей уменьшилось на 47 % у самцов ($p < 0,001$ по критерию Хи-квадрат) и на 8 % у самок, а в

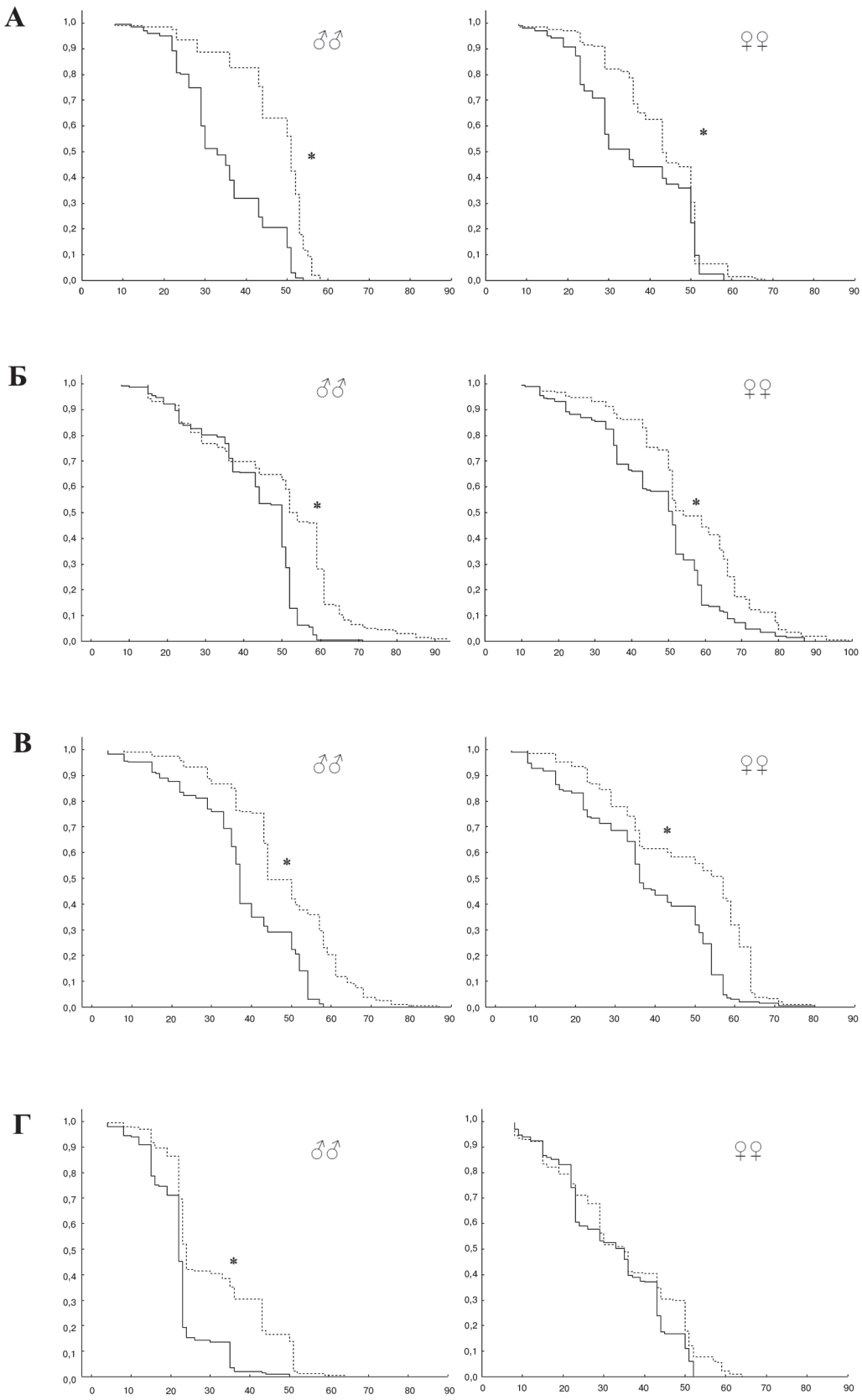

Рис. 4. Кривые выживаемости самцов (♂♂) и самок (♀♀) дрозофилы линий *Canton-S* (А), *FOXO*[21] (Б), *FOXO*[25] (В) и *FOXO*[21]/*FOXO*[25] (Г) в первой экспериментальной повторности
Обозначения: ——— 12 ч, – – – – 0 ч, * — различия достоверны при $p < 0{,}001$ (по критерию Колмогорова–Смирнова)

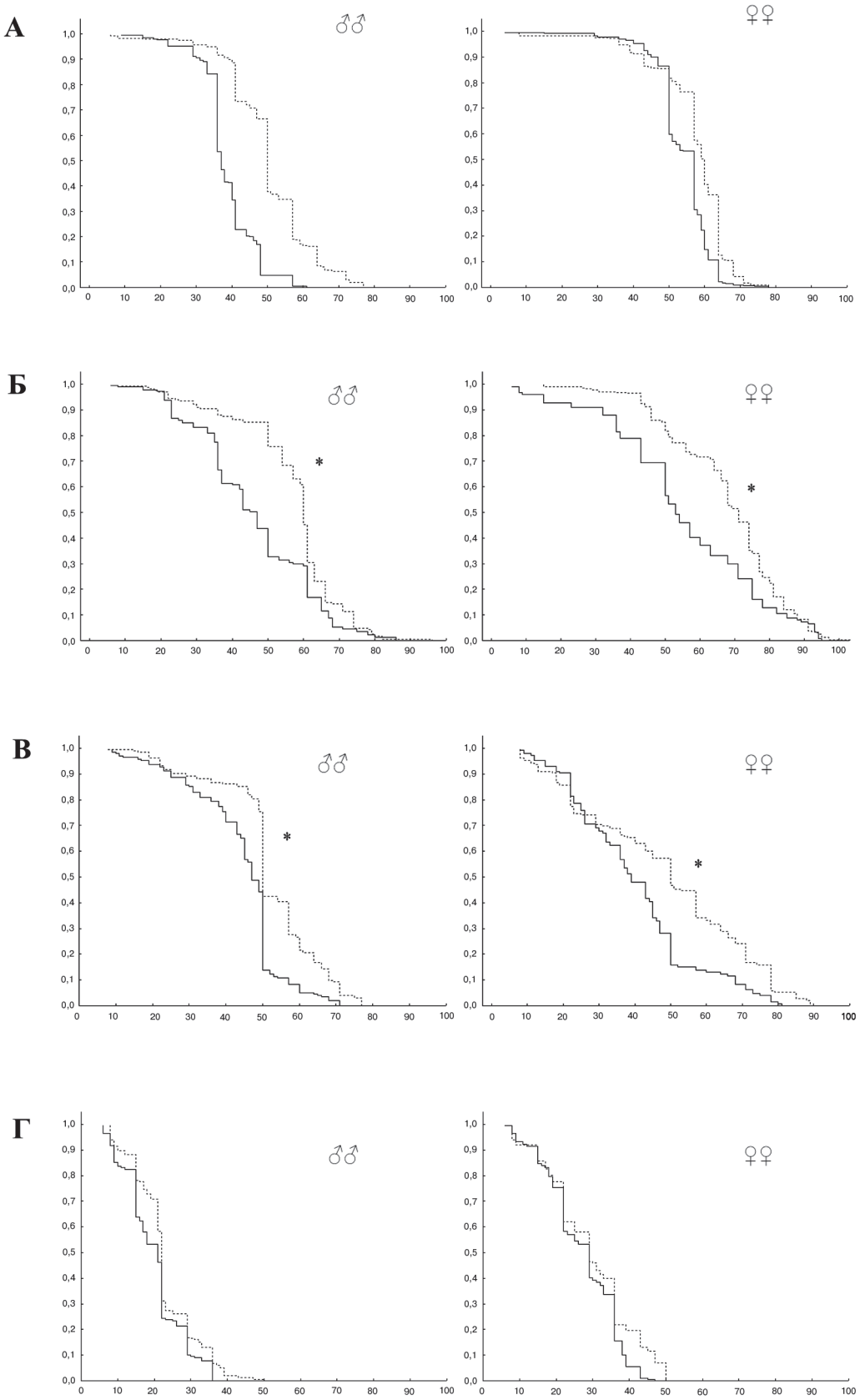

Рис. 5. Кривые выживаемости самцов (♂♂) и самок (♀♀) дрозофилы линий *Canton-S* (А), *FOXO*^{21} (Б), *FOXO*^{25} (В) и *FOXO*^{21}/*FOXO*^{25} (Г) во второй экспериментальной повторности.
Обозначения: ————12 ч, – – – – 0 ч,* — различия достоверны при $p < 0{,}001$ (по критерию Колмогорова–Смирнова)

другой увеличилось (на 29 % у самцов и на 37 % у самок при $p < 0,001$ по критерию Хи-квадрат) (табл. 3). Кривые выживаемости достоверно различаются в обоих повторностях эксперимента как у самцов, так и у самок ($p < 0,001$ по критерию Колмогорова–Смирнова) (рис. 4–5Б). При содержании самцов и самок другой гетерозиготной родительской линии *FOXO*[25] в темноте в двух независимых повторностях эксперимента МеПЖ самцов и самок в темноте достоверно ($p < 0,001$) возросла на 6–16 % и 20–22 %, соответственно, время 90 %-ной гибели особей увеличилось на 15–16 % ($p < 0,001$) и 11–13 %, соответственно. При этом у самцов в темноте на 6–15 % уменьшилось значение параметра α уравнения Гомпертца по сравнению с самцами, содержащимися при стандартном режиме освещения, и соответственно увеличилось MRDT. У самок в темноте параметр α в одном эксперименте увеличился на 15 %, а в другом уменьшился на 11 %. В соответствии с этим изменялось и значение MRDT (табл. 3). Кривые выживаемости достоверно различались в обоих повторностях эксперимента как у самцов, так и у самок ($p < 0,001$ по критерию Колмогорова-Смирнова) (рис. 4–5). У особей с гипоморфным генотипом (линия *FOXO*[21]/*FOXO*[25]) в двух повторностях эксперимента различия в ПЖ в темноте и на свету наблюдались в меньшей степени по сравнению с родительскими линиями и линией дикого типа (табл. 3). Кривые выживаемости достоверно различались лишь у самцов в одном из вариантов экспериментов ($p < 0,001$ по критерию Колмогорова–Смирнова) (рис. 4–5Г). У самок в обеих повторностях и у самцов в одной из экспериментальных повторностей кривые выживаемости на свету и в темноте практически совпадают.

ОБСУЖДЕНИЕ

Существует два относительно независимых генетических механизма изменения продолжительности жизни при разных условиях освещения. Согласно главенствующей точке зрения (рис. 1, слева), увеличение длины светового дня может приводить к более высокому уровню метаболизма вследствие интенсификации двигательной активности и изменения температуры тела дрозофил, что сопровождается дополнительным образованием токсичных побочных продуктов — свободных радикалов (Sheeba et al., 2002). Для проверки данного предположения мы исследовали линии с мутациями в генах *dSir2* и *Hsp70*, участвующих в борьбе с последствиями окислительного стресса. Ожидалось, что у исследуемых линий произойдет увеличение различия ПЖ в темноте и на свету по сравнению с аналогичной разницей у линии дикого типа.

Согласно нашим результатам, у линии, несущей в гомозиготе делецию гена *dSir2*, разница МеПЖ в темноте и на свету была более значительна — 24–33 %, чем у гетерозиготной линии *Sir2*/+ (0–12 %) и контрольной линии w^{1118} (3–17 %). Таким образом, делеция гена *dSir2*, регулирующего устранение оксидативных повреждений (Balaban, Nemoto, Finkel, 2005), обеспечивает более значимое снижение ПЖ на свету, чем это ожидается, основываясь на эффектах у линии дикого типа или мутантов-гетерозигот. Стоит отметить, что мутация в гене *dSir2* в нашем эксперименте привела к значительному снижению ПЖ по сравнению с линией дикого типа, что согласуется с литературными данными. Гены сиртуинов играют ключевую роль в регуляции скорости старения и долголетия. В частности, повсеместное подавление экспрессии *dSir2* и двух *dSir2*-подобных генов (*CG5085* и *CG6284*) методом интерференции РНК в нейронах дрозофил снижает ПЖ, а увеличение активности сиртуинов у дрожжей, червей или мух значительно продлевает ПЖ (Kusama et al., 2006; Li et al., 2008; Niedernhofer et al., 2008; Russell, Kahn, 2007).

Существенное снижение МеПЖ на свету происходит и у линий с мутациями в генах семейства *Hsp70*. Если в контроле (у линии дикого типа *Canton-S*) в данном варианте эксперимента время 90 %-й гибели особей при содержании в условиях затемнения возросло на 4–10 %, у линий с различными делециями *Hsp70* время 90 %-й гибели в темноте увеличилось на 7–29 % в зависимости от пола и линии. Белки семейства *Hsp70* отличаются консервативностью последовательности в эволюционном ряду от *Escherihia coli* до человека. В клетке *Hsp70* выполняют функцию молекулярных шаперонов, защищая белки от неправильной укладки третичной структуры, денатурации и агрегации. Они предотвращают нарушение нормальных клеточных процессов — митоза, мейоза или защищают клетки от повреждения внешними стрессами (Hunt et al., 2004). Стресс-индуцибельный *Hsp70B* стимулирует эксцизионную репарацию оснований (активность урацилгликозилазы). Воздействие малыми интерферирующими РНК, ингибирующими синтез *Hsp70*, напротив, снижает репарацию. Аналогично меняется и выживаемость клеток (Bases, 2006). Согласно литературным данным, сверхэкспрессия генов *Hsp27*, *Hsp70*, или *Hsp90* предотвращает апоптоз, вызванный различными стимулами, включая окислительный стресс, в то время как ингибирование этих белков делает клетку чувствительной к апоптозу (Lanneau et al., 2007). Сверхэкспрессия *Hsp90* и *Hsp70* у дрозофилы приводит к увеличению ПЖ. Сверхэкспрессия митохондриального *Hsp22* увеличивает ПЖ и устойчивость к окислительному стрессу у *D. melanogaster* (Guo et al., 2007; Soti, Csermely, 2007). Таким образом, белки теплового шока играют важную роль в ответе на окислительный стресс и в детерминации ПЖ у животных. Об этом свидетельствуют и наши данные: особи с мутациями в генах семейства *Hsp70* имеют значительно меньшую ПЖ по сравнению с линией дикого типа.

В предыдущих наших работах (Москалев и др., 2006; Москалев и др., 2008; Москалев, Малышева, 2009) было установлено, что линии с мутациями в дру-

гих генах, участвующих в устранении внутриклеточных повреждений, в частности гена *Sod*, отвечающего за детоксификацию свободных радикалов и mus210, вовлеченного в репарацию ДНК, характеризуются более выраженной разницей между продолжительностью жизни в темноте и на свету по сравнению с диким типом. Таким образом, предыдущие и представленные в настоящей работе результаты подтверждают предположение, согласно которому снижение ПЖ при содержании на свету связано с дополнительной выработкой свободных радикалов.

Второй возможный механизм влияния светового режима на выживаемость (рис. 1, справа) может быть связан с индукцией стресс-ответа при ухудшении условий жизни, поскольку укорочение длины светового дня в естественных условиях обитания сигнализирует о необходимости физиологической перестройки с целью подготовиться к переживанию зимних условий, либо к длительной миграции. Например, бабочка-монарх *Danus plexiplus* в ответ на осеннее укорочение длины светового дня вступает в состояние репродуктивной диапаузы (Tatar, 2004). В таком состоянии взрослые особи выживают 5–6 месяцев. Напротив, не находящиеся в диапаузе взрослые особи летней популяции живут менее 6 недель. Значительной продолжительности жизни диапаузных бабочек-данаид способствуют физиологическое состояние замедленного старения, регулируемого нейроэндокринно. Установлено, что хирургическое удаление corpus allata, нейроэндокринной ткани, вырабатывающей ювенильный гормон, снижает темп смертности этих бабочек и увеличивает их продолжительность жизни (Tatar, 2004). Взрослые особи, обработанные ювенильным гормоном, напротив, характеризуются возросшей смертностью (Tatar, 2004). У диких видов рода Drosophila, например у *Drosophila triauraria* из Северной Японии и *Drosophila littoralis* из Финляндии, короткая фотофаза индуцирует взрослую репродуктивную диапаузу, наподобие той, что встречается у бабочек-данаид (Tatar, 2004). Приведенные выше примеры подтверждают тот факт, что ПЖ находится в прямой зависимости от стрессоустойчивости. Предполагается, что в ответ на разные виды стрессоров у животных подавляется активность инсулин/IGF-1 сигнального пути и снижается синтез вторичных гормонов (например, ювенильного гормона у насекомых). Такого рода изменения сопровождаются разблокировкой активности транскрипционного фактора FOXO, контролирующего работу эффекторных генов клеточной защиты (Huang, Tindall, 2006). FOXO опосредует ответ на окислительный и другие виды стресса, что зачастую связано с увеличением ПЖ (Giannakou, Partridge, 2004; Vogt et al., 2005; Lam et al., 2006). В зависимости от интенсивности неблагоприятного воздействия происходят пострансляционная модификация и связывание FOXO со специфическими белками мишенями, что определяет изменение экспрессии генов-мишеней и дифференциальную реакцию клетки: слабый стресс приводит к интенсификации метаболизма, умеренный — запускает процессы восстановления, сильный — индуцирует апоптоз (Boudewijn et al., 2003; Kramer, 2003; Lee et al., 2003; Lam et al., 2006; Saunders, Verdin, 2009; Vogt et al., 2005). Сверхэкспрессия гена FOXO у особей *C. elegans* и в клетках млекопитающих приводила к повышению активности супероксиддисмутазы и резистентности к окислительному стрессу (Coffer, 2003; Liu et al., 2005; Lam et al., 2006). Постоянная сверхэкспрессия dFOXO в жировом теле взрослых особей дрозофил снижает темп смертности, увеличивает устойчивость к индуктору свободных радикалов — параквату и увеличивает ПЖ мух (Giannakou et al., 2007). Таким образом, FOXO играет важную роль в поддержании баланса между процессами роста и размножения, с одной стороны, и стрессустойчивостью и долгожительством — с другой (Calnan, Brunet, 2008).

Мы предположили, что ключевая роль в увеличении ПЖ в темноте принадлежит FOXO. Вероятно, укорочение длины светового дня подавляет выработку нейросекреторными клетками инсулина, что сопровождается активацией FOXO и его генов-мишеней, повышающих уровень защиты клеток от спонтанных повреждений. В нашем эксперименте особи, гетерозиготные по гипоморфным аллелям гена FOXO, а также особи линии дикого типа отличались существенным изменением продолжительности жизни при разных условиях освещения, однако у особей-гомозигот с гипоморфным генотипом (линия $FOXO^{21}/FOXO^{25}$) в двух повторностях эксперимента различия ПЖ в темноте и на свету были незначительными — кривые выживаемости достоверно различались лишь в одном из вариантов экспериментов у самцов. По-видимому, минимальные различия сохранялись по той причине, что индукция FOXO-зависимых механизмов стрессоустойчивости может осуществляться не только в ответ на подавление выработки инсулиноподобных пептидов в темноте, но и в ответ на окислительный стресс при освещении, что усугубило эффект снижения ПЖ при освещении.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные говорят о существовании двух относительно независимых путей регуляции ответа на изменение режимов освещения (рис. 1). С одной стороны, увеличение длины светового дня через более активную выработку свободных радикалов оказывает повреждающее действие и снижает ПЖ дрозофилы. Действительно, у линии с делецией по гену *dSir2* разница в ПЖ в темноте и на свету значительно увеличивается по сравнению с контрольными линиями, а у линий с мутациями в генах белков теплового шока наблюдается выраженная тенденция к снижению ПЖ на свету. С другой стороны, снижение длины светового дня, не приводя к повреждающим эффектам, стимулирует стресс-ответ и увеличивает ПЖ. В то время как у линии дикого типа

и мутантов-гетерозигот по транскрипционному фактору *FOXO* сохранялась значительная разница в ПЖ при содержании в темноте и на свету, у мутантов-гомозигот ПЖ в темноте и на свету в трех случаях из четырех изменялась незначительно.

Исследования поддержаны грантом РФФИ (08-04-00456-а), грантом Президиума РАН, молодежным научным грантом УрО РАН на 2009–2010 гг.

Литература

1. *Анисимов В. Н.,* 2008. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Т. 2. СПб.: Наука. 434 с.
2. *Анисимов В. Н.,* 2000. Фундаментальные исследования в геронтологии: основные направления и перспективы // Генетика. Т. 36. № 8. С. 1013–1016.
3. *Анисимов В. Н., Соловьев М. В.,* 1999. Эволюция концепций в геронтологии. СПб.: Эскулап. 130 С.
4. *Виноградова И. А., Букалев А. В., Забежинский М. А., Семенченко А. В., Анисимов В. Н.,* 2007. Влияние светового режима и мелатонина на гомеостаз, продолжительность жизни и развитие спонтанных опухолей у самок крыс // Успехи геронтологии. Т. 20. № 4. С. 40–47.
5. *Виноградова И. А., Букалев А. В., Забежинский М. А., Семенченко А. В., Анисимов В. Н.,* 2008. Влияние светового режима и мелатонина на гомеостаз, продолжительность жизни и развитие спонтанных опухолей у самцов крыс // Вопросы онкологии. Т. 54. № 1. С. 70–77.
6. *Гаврилов Л. А., Гаврилова Н. С.,* 1986. Биология продолжительности жизни. Количественные аспекты. М.: Наука, 169 С.
7. *Ермаков С.П., Гаврилов Н. С.,* 1987. Первичная статистическая обработка данных по выживаемости организмов // Итоги науки и техники. ВИНИТИ. Общие проблемы биологии. Т. 6. С. 230–276.
8. *Крутько В. Н., Славин М. Б., Смирнова Т. М.,* 2002. Математические основания геронтологии. М.: Едиториал УРСС. 384 С.
9. *Лакин Г. Ф.,* 1990. Биометрия. М.: Высш. шк. 352 С.
10. *Москалев А. А.,* 2004. Радиационно-индуцированное изменение продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*. Сыктывкар. 104 С.
11. *Москалев А. А.,* 2008. Старение и гены. СПб.: Наука. 358 С.
12. *Москалев А. А., Кременцова А. В., Малышева О. А.,* 2008. Влияние мелатонина на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* при различных режимах освещения Экологическая генетика // Т. 6. № 3. С. 22–30.
13. *Москалев А. А. Малышева О. А.,* 2009. Роль светового режима в регуляции продолжительности жизни // Экология. № 3. С. 221–226.
14. *Москалев А. А., Шосталь О. А., Зайнуллин В. Г.,* 2006. Генетические аспекты влияния различных режимов освещения на продолжительность жизни дрозофилы // Успехи геронтол. Вып. 18. С. 55–58.
15. *Панасенко О. О., Ким М. В., Гусев Н. Б.,* 2003. Структура и свойства малых белков теплового шока // Успехи биологической химии. Т. 43. С. 59–98.
16. *Турышева Е. В., Шапошников М. В., Москалев А. А.,* 2008. Адаптивный ответ по продолжительности жизни у линий *Drosophila melanogaster* с мутациями генов фактора теплового шока и белков теплового шока // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 48. № 5. С. 580–587.
17. *Anisimov V. N., Baturin D. A., Popovich I. G. et al.,* 2004. Effect of exposure to light-at-night on life span and spontaneous carcinogenesis in female CBA mice // Int. J. Cancer. Vol. 111. P. 475–479.
18. *Antoch M. P., Gorbacheva V. Y., Vykhovanets O. et al.,* 2008. Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis // Cell Cycle. Vol. 7. № 9. P. 1197–1204.
19. *Arya R., Mallik M., Lakhotia S. C.,* 2007. Heat shock genes — integrating cell survival and death // J. Biosci. Vol. 32. P. 595–610.
20. *Ashburner M.,* 1989. Drosophila: A laboratory handbook. Cold Spr. Harb. Lab. Press, 1331 P.
21. *Balaban R. S., Nemoto S., Finkel T.,* 2005. Mitochondria, oxidants and aging // Cell. Vol. 120. P. 483–495.
22. *Berdichevsky A., Viswanathan M., Horvitz H. R., Guarente L.,* 2006. C. elegans SIR-2. 1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span // Cell. Vol. 125. P. 1165–1177.
23. *Boudewijn M. T., Medema B. R. H.,* 2003. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty // Journal of Leukocyte Biology. N. 73. P. 689–701.
24. *Calnan D. R., Brunet A.,* 2008 // Oncogene. Vol. 27. N 16. P. 2276–2288.
25. *Coffer P.,* 2003. OutFOXing the grim reaper: Novel mechanisms regulating longevity by Forkhead transcription factors // Sci. STKE. P. 39.
26. *Cheng C.-L., Gao T. -Q., Wang Z., Li D.-D.,* 2005. Role of insulin/insulin-like growth factor 1 signaling pathway in longevity // World J. Gastroenterol. Vol. 11. N 13. P. 1891–1895.
27. *Fabrizio P., Gattazzo C., Battistella L. et al.,* 2005. Sir2 blocks extreme life-span extension // Cell. Vol. 123. P. 655–667.
28. *Giannakou M. E., Partridge L.,* 2004. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival // Trends in Cell Biology. Vol. 14. N 8. P. 408–412.
29. *Giannakou M. E., Jacobson G. M. et al.,* 2007. Dinamics of the action of *dFOXO* on adult mortality in *Drosophila* // Aging Cell. Vol. 6. N 4. P. 429–438.

30. *Guarente L., Kenyon C.,* 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms // Nature. Vol. 409. P. 255–262.
31. *Guo S., Wharton W., Moseley P., Shi H.,* 2007. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities // Cell Stress and Chaperones. Vol. 12. N. 3. P. 245–254.
32. *Hardeland R., Coto-Montes A., Poeggeler B.,* 2003. Circadian rhythms, oxidative stress and antioxidative defense mechanisms // Chronobiol. Int. Vol. 20. P. 921–962.
33. *Harman D.,* 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // J. Gerontol. Vol. 11. N 3. P. 298–300.
34. *Helfand S. L., Rogina B.,* 2003. Genetics of aging in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // Annu. Rev. Genet. N. 37. P. 329–348.
35. *Huang C., Tindall D. J.,* 2006. *FOXO* factors: a matter of life and death // Future Oncol. Vol. 2. N. 1. P. 83-89.
36. *Huang C., Xiong C., Kornfeld K.,* 2004. Measurement of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans* // proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 101. N 21. P. 8084-8089.
37. *Hunt C. R, Dix D. J., Sharma G. G ., Pandita R. K et al.,* 2004. Genomic Instability and Enhanced Radiosensitivity in Hsp70. 1- and Hsp70. 3-Deficient Mice. // Molecular and cellular biology. Vol. 24. N. 2. P. 899–911.
38. *Junger M. A., Rintelen F., Stocker H. et al.,* 2003. The Drosophila Forkhead transcription factor *FOXO* mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling // J. Biol. Vol. 2. N. 3. P. 20.
39. *Kimura K., Tanaka N., Nakamura N., Takano S., Ohkuma S.,* 2006. Knock-down of mitochondrial heat shock protein 70 promotes progeria-like phenotypes in *C. eleganset* // J. Biol. Chem. Vol. 282. N 8. P. 5910–5918.
40. *Kondratov R. V.,* 2007. A role of the circadian system and circadian proteins in aging // Aging Res. Rev. Vol. 6. N 1. P. 12–27.
41. *Kramer J. M. Davidge J. T., Staveley L., Staveley B. E.,* 2003. Expression of *Drosophila FOXO* regulates growth and can phenocopy starvation // BMC Developmental Biology. Vol. 3. N 5. P. 1–14.
42. *Kusama S., Ueda R., Suda T., Nishihara S., Matsuura E.,* 2006. Involvement of *Drosophila* Sir2-like genes in the regulation of life span // Genes Genet Syst. Vol. 81. N 5. P. 341–348.
43. *Lam E. W. -F., Francis R. E., Petkovic M.,* 2006. FOXO transcription factors: key regulators of cell fate // Biochem. l Soc. Transact. Vol. 34. N 5. P. 722–726.
44. *Landis G. N., Abdueva D., Skvortsov D. et al.,* 2004. Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 101. N. 20. P. 7663–7668.
45. *Lanneau D., Thonel A., Maurel S., Didelot C., Garrido C.,* 2007. Apoptosis Versus Cell Differentiation Role of Heat Shock Proteins HSP90, HSP70 and HSP27 // Landes Bioscience. P. 53–60.
46. *Lee S. S., Kennedy S., Tolonen A. C., Ruvkun G.,* 2003. DAF-16 Target Genes That Control C. elegans Life-Span and Metabolism // Science. Vol. 300. N. 644. P. 644–647.
47. *Li J. E. A., Dong Y. R. G., Iwata T., Lee S. S.,* 2008. Caenorhabditis elegans HCF-1 functions in longevity maintenance as a DAF-16 regulator // PLoS Biol. Vol. 6. N 9. P. 1870–1886
48. *Liu J.-W., Chandra D., Rudd M. D. et al.,* 2005. Induction of prosurvival molecules by apoptic stimuli: involvement of FOXO3a and ROS // Oncogene. Vol. 24. P. 2020–2031.
49. *Majercak J. M.,* 2002. The effects of light and temperature on the Drosophila circadian clock // Dissertation Abstracts International. Vol. 62. N 1. P. 98.
50. *Massie H. R., Aiello V. R., Williams T. R.,* 1993. Influence of photosensitizers and light on the life span of *Drosophila* // Mech. Ageing Dev. Vol. 68, N 1–3. P. 175–182.
51. *Massie H. R, Whitney S. J.,* 1991. Preliminary evidence for photochemical ageing in *Drosophila* // Mech. Ageing Dev. Vol. 58. N 1. P. 37–48.
52. *Morrow G., Samson M., Michaud S., Tanguay R. M.,* 2004. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress // FASEB J. Vol. 18. N 3. P. 598–599.
53. *Moskalev A.,* 2007. Radiation-induced life span alteration of drosophila lines with genotype differences // Biogerontology. Vol. 8. N 5. P. 499–504.
54. *Moskalev A., Shaposhnikov M., Turysheva E.,* 2008. Life span alteration after irradiation in *Drosophila melanogaster* strains with mutations of Hsf and Hsps // Biogerontology. Vol. 10. N 1. P. 3–11.
55. *Niedernhofer L. J., Robbins P. D.,* 2008. Signaling mechanisms involved in the response to genotoxic stress and regulating lifespan // Biochem Cell Biol. Vol. 40. N 2. P. 176-180.
56. *Partridge L., Gems D., Withers D. J.,* 2005. Sex and Death:What Is the Connection? // Cell. Vol. 120. P. 461–472.
57. *Pletcher S. D.,* 1999. Model fitting and hypothesis testing for age specific mortality data // Journal of Evolutionary Biology. N 12. P. 430–439.
58. *Rogina B., Helfand S. L.,* 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction // PNAS. Vol. 101. N. 45. P. 15998–16003.
59. *Russell S. J, Kahn C. R.,* 2007. Endocrine regulation of ageing // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Vol. 8. N 9. P. 681–691.
60. *Sasaki S., Fukuda N.,* 2006. Dose-response relationship for life-shortening and carcinogenesis I mice irradiated at day 7 postnatal age with dose range be-

low 1 Gy of gamma rays // J. Radiat. Res. Vol. 47. P. 135–145.
61. *Saunders L. R., Verdin E.,* 2009. Cell biology. Stress response and aging // Science. Vol. 323. N 5917. P. 1021–1022.
62. *Sheeba V., Sharma V. K., Shubha K., Chandrashekaran M. K., Joshi A.,* 2000. The effect of different light regimes on adult life span in *Drosophila melanogaster* is partly mediated through reproductive output // J. Biol. Rhythms. Vol. 15. N5. P. 380–392.
63. *Sheeba V., Chandrashekaran M. K., Joshi A., Sharma V. K.,* 2002. Developmental plasticity of the locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* // J. Insect Physiol. Vol. 48. N 1. P. 25–32.
64. *Soti C., Csermely P.,* 2007. Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease // J. Biosci. N. 32. P. 511–515.
65. *Tanno M., Sakamoto J., Miura T., Shimamoto K., Horio Y.,* 2007. Nucleocytoplasmic Shuttling of the NAD-dependent Histone Deacetylase SIRT1 // J. Biol. Chem. Vol. 282. N 9. P. 6823–6832.
66. *Tatar M.,* 2004. The neuroendocrine regulation of Drosophila aging // Experimental Gerontology. N 39. P. 1745–1750.
67. *Vogt P. K., Jiang H., Aoki M.,* 2005. Triple layer control: Phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins // Cell Cicle. Vol 4. N 7. P. 908–913.
68. *Vinogradova I. A., Anisimov V. N., Bukalev A. V. et al.,* 2009. Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in rats // Aging. Vol. 1. N. 10. P. 855–865.
69. *Wang C., Li Q., Redden D. T. et al.,* 2004. Statistical methods for testing effects on "maximum lifespan" // Mech. Ageing Dev. Vol. 125. № 9. P. 629–632.
70. *Xiangzhong Z., Yang Z., Yue Z. et al.,* 2007. FOXO and insulin signaling regulate sensitivity of the circadian clock to oxidative stress // PNAS. Vol. 104. N. 40. P. 15899–15904.

THE ROLE OF TRANSCRIPTION FACTORS *DFOXO, DSIR2* AND *HSP70* IN LIFESPAN ALTERATION OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* IN DIFFERENT LIGHT CONDITIONS

Moskalev A. A., Malysheva O. A.

❀ **SUMMARY: It was investigated the role of stress-response genes *(dFOXO, dSir2, Hsp70)* in regulation of life span of *Drosophila* in response to light regime alteration. It was revealed the FOXO-dependant mechanism of lifespan increasing at darkness conditions. The distance of lifespan of FOXO homozygous mutants at different light conditions were absent 3 times from 4 times. It was shown, that homozygotes with deletion of *dSir2* have more significant difference between lifespan at standard light and darkness conditions with comparing to wild type and heterozygous strain. The same tendency was also detected the in the strains with *Hsp70* deletions. It was produced the evidences of two mechanisms of light regime influence on lifespan: metabolism intensification at light conditions and neuroendocrine-determinated lifespan increasing at darkness conditions.**

❀ **KEY WORDS:** life span; *Drosophila melanogaster*; light regime; FOXO; sirtuins; Hsp.

❀ Информация об авторах

Москалев Алексей Александрович — д. б. н.
Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,
167982 г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28
E-mail: amoskalev@list.ru.

Малышева Ольга Андреевна —
Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,
167982 г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28
E-mail: directorat@ib.komisc.ru.

Moskalev Alexey Alexandrovich — doctor of biological science.
Institute of Biology, Komi Scientific Centre, Ural Branch, Russian Academy of Science. Kommunisticheskaya, 28, Syktyvkar, 167982, Russia. E-mail: amoskalev@list.ru.

Malysheva Olga Andreevna —
Institute of Biology, Komi Scientific Centre, Ural Branch, Russian Academy of Science. Kommunisticheskaya, 28, Syktyvkar, 167982, Russia. E-mail: directorat@ib.komisc.ru.

ВЫ СПРАШИВАЕТЕ

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

НАСТОЯЩИЕ ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЯВЛЯЮТСЯ ИЗДАТЕЛЬСКИМ ДОГОВОРОМ

Условия настоящего Договора (далее «**Договор**») являются публичной офертой, в соответствии с п. 2 ст. 437 Гражданского кодекса Российской Федерации. Данный **Договор** определяет взаимоотношения между редакцией журнала «Ecological genetics/Экологическая генетика», зарегистрированной Государственным комитетом Российской Федерации по печати (свидетельство о регистрации номер № 77–16900 от 20 ноября 2003 года), именуемой в дальнейшем «**Редакция**» и являющейся структурным подразделением ООО «Издательство Н-Л», и Автором и/или Авторским коллективом (или иным правообладателем), именуемым в дальнейшем «**Автор**», принявшим публичное предложение (оферту) о заключении **Договора**.

I ПОЛИТИКА ЖУРНАЛА

1. При рассмотрении полученных авторских материалов **Редакция** руководствуется Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication http://www.icmje.org/index.html).
2. В журнале «Экологическая генетика» печатаются ранее не опубликованные экспериментальные и обзорно-теоретические работы на русском и английском языках по профилю Журнала.
3. Множественные и дублирующие публикации — это публикации статьи, материалы которой во многом совпадают с уже однажды опубликованными.
4. Представляя рукопись, **Автор** всегда должен ставить редакцию в известность обо всех предыдущих публикациях, которые могут рассматриваться как множественные или дублирующие публикации той же самой или очень сходной работы.
5. **Редакция** не рассматривает работы, результаты которых по большей части уже были опубликованы или описаны в статьях, представленных или принятых для публикации в другие печатные или электронные средства массовой информации
6. **Автор** должен уведомить **Редакцию** в случае, если статья содержит уже опубликованные материалы, и в обязательном порядке включить в статью ссылки на них. Копии таких материалов должны прилагаться к представляемой рукописи, чтобы дать редакции возможность принять решение, как поступить в данной ситуации.
7. Не принимаются к печати рукописи, представляющие собой отдельные этапы незавершенных исследований, а также работы, выполненные с нарушением Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (http://gene-on-gene.narod.ru/Rules/animals.htm).
8. Публикация статьи возможна только после получения положительных рецензий.
9. **Все статьи, в том числе статьи аспирантов и докторантов, публикуются бесплатно.**

II АВТОРСКОЕ ПРАВО

Редакция отбирает, готовит к публикации и публикует переданные **Авторами** материалы. Авторское право на конкретную статью принадлежит авторам статьи. Авторский гонорар за публикации статей в Журнале не выплачивается. **Автор** передает, а **Редакция** принимает авторские материалы на следующих условиях:

1) **Редакции** передается право на оформление, издание, передачу Журнала с опубликованным материалом **Автора** для целей реферирования статей из него в Реферативном журнале ВИНИТИ, РНИЦ и Базах данных, распространение Журнала/авторских материалов в печатных и электронных изданиях, включая размещение на выбранных либо созданных **Редакцией** сайтах в сети Интернет в целях предоставления доступа к публикации любого заинтересованного лица, а также на распространение Журнала с опубликованным материалом **Автора** по подписке;
2) территория, на которой разрешается использовать авторский материал, — Российская Федерация и сеть Интернет;
3) срок действия Договора — 5 лет. По истечении указанного срока **Редакция** оставляет за собой, а **Автор** подтверждает бессрочное право **Редакции** на продолжение размещения авторского материала в сети Интернет;
4) **Редакция** вправе по своему усмотрению без каких-либо согласований с **Автором** заключать договоры и соглашения с третьими лицами, направленные на дополнительные меры по защите авторских и издательских прав;
5) **Автор** гарантирует, что использование **Редакцией** предоставленного им по настоящему **Договору** авторского материала не нарушит прав третьих лиц;
6) **Автор** оставляет за собой право использовать предоставленный по настоящему **Договору** авторский материал са-

мостоятельно, а также передавать права на него по договору третьим лицам, если это не противоречит настоящему **Договору**;

7) **Редакция** предоставляет **Автору** возможность безвозмездного получения одного авторского экземпляра из вышедшего тиража печатного издания с публикацией материалов **Автора** или получения справки с электронными адресами его официальной публикации в сети Интернет;
8) При перепечатке статьи или ее части ссылка на первую публикацию в Журнале обязательна;
9) **Редакция** вправе издавать Журнал любым тиражом.

III ПОРЯДОК ЗАКЛЮЧЕНИЯ ДОГОВОРА И ИЗМЕНЕНИЯ ЕГО УСЛОВИЙ

Заключением **Договора** со стороны **Редакции** является опубликование рукописи данного **Автора** в журнале «Ecological genetics/Экологическая генетика» и размещение его текста в сети Интернет. Заключением **Договора** со стороны **Автора**, т. е. полным и безоговорочным принятием **Автором** условий **Договора**, является передача **Автором** рукописи и сопроводительных документов **Редакции**. Задержка **Автором** корректуры дает **Редакции** право выпустить произведение в свет без авторской правки или отсрочить опубликование рукописи. **Редакция** вправе в одностороннем порядке изменять условия **Договора** и корректировать его положения, публикуя уведомления об изменениях в Журнале (в Правилах для авторов Журнала), а также на сайте Издательства.

IV ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РУКОПИСИ В ЖУРНАЛ

Автор передает, а **Редакция** принимает авторский оригинал. Первоначально следует выслать электронный вариант рукописи на адрес редакции ecolgenet@list.ru.

Электронный вариант должен содержать:

- файл с текстом рукописи (формат Microsoft Word или совместимый с ним);
- файлы рисунков (форматы TIFF, EPS);
- файлы электронных визитных карточек авторов (формат VCF);
- файл, содержащий сведения об авторах, в котором на русском и английском языках должны быть указаны: Фамилия, Имя, Отчество, должность, ученая степень, ученое звание, название организации (компании), подразделения (отдел, лаборатория). Информация, содержащаяся в этом файле, будет опубликована в соответствующем разделе статьи.

После получения подтверждения по электронной почте о соответствии представленной рукописи всем требованиям в редакцию высылается подписанная автором рукопись в двух экземплярах (коллективная рукопись подписывается всеми соавторами) в конверте из плотной бумаги. Фотографии, слайды, негативы и рисунки, выполненные на прозрачной пленке, следует поместить в отдельный конверт из плотной бумаги.

Датой поступления Рукописи в журнал считается дата получения электронной версии, оформленной в полном соответствии с данными правилами. Предварительное рассмотрение рукописи, не заказанной **Редакцией**, не является фактом заключения издательского Договора между сторонами.

V СОПРОВОДИТЕЛЬНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

К авторскому оригиналу бумажной версии необходимо приложить:

- **сопроводительное письмо** (направление от учреждения, в котором выполнялась работа, подписанное всеми авторами);
- **экспертное заключение** о возможности опубликования в открытой печати.

Бланки сопроводительных документов можно получить по запросу на адрес редакции и на сайте журнала.

В сопроводительных документах может дополнительно содержаться любая другая информация, которая может быть полезна редакции, например, к какому типу публикуемых в данном журнале статей относится представляемая рукопись (см. рубрикатор Журнала), согласен ли автор (авторский коллектив) оплатить стоимость воспроизведения цветных иллюстраций.

К рукописи необходимо приложить все разрешения на воспроизведение уже опубликованного материала, использование иллюстраций или информацию, по которой можно установить личность людей, представленных на фотографиях, а также на указание фамилий лиц, внесших вклад в данную работу.

VI ФОРМАТ И СТРУКТУРА РУКОПИСЕЙ

Структура **обзорно-теоретической статьи** обычно включает следующие разделы: введение, изложение основного материала, заключение, литература.

Структура **статьи экспериментального характера** обычно включает следующие разделы: введение, материал и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, литература.

Для всех присылаемых рукописей едиными являются нижеследующие требования:

1. **Заглавие** должно быть кратким (не более 120 знаков включая пробелы), точно отражающим содержание статьи.
2. **Резюме** (до 600 знаков включая пробелы) на русском языке помещают перед текстом статьи. Резюме не требуется при публикации персоналий, рецензий, отчетов о конференциях, информационных писем. При превышении предельного размера резюме **Редакция** оставляет за собой право на его редакторскую правку (сокращение).
3. **Заглавие** на английском языке помещают перед текстом английского резюме.
4. **Резюме** на английском языке помещают после текста статьи.
5. **Ключевые слова:** от 3 до 10 ключевых слов или коротких фраз, которые будут способствовать корректному перекрестному индексированию статьи, помещаются под русским резюме с подзаголовком «ключевые слова» и под английским резюме с подзаголовком «key words». Для выбора ключевых слов используйте термины из списка медицинских предмет-

ных заголовков (Medical Subject Headings, http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html). Если в этом списке отсутствуют подходящие обозначения для недавно введенных терминов, подберите наиболее близкие из имеющихся.

6. **Статьи по тематике «Генетика микроорганизмов»** должны соответствовать требованиям, обязательным при упоминании и/или описании микроорганизмов (см. Генетика. 1986. Т. 22, № 11. С. 2734).
7. **УДК** можно сформировать, обратившись на сайт http://teacode.com/online/udc/57/57.html.
8. **Предпочтительная рубрика журнала выбирается из нижеследующего списка:**

   Биоинформатика.
   Генетика поведения.
   Генетика популяций и эволюция.
   Генетическая токсикология и генетически-активные факторы среды.
   История и персоналии, рецензии, информация.
   Механизмы модификационной изменчивости.
   Мутагенез и канцерогенез.
   Образование в области экологической генетики.
   Симбиогенетика.
   Старение и долголетие.
   Болезни зрелого возраста.
   Экологическая генетика трансгенных организмов.
   Экологическая генетика человека.
   Эколого-генетические модели.
9. **В разделе «Материал и методы»** обязательно указываются сведения о статистической обработке экспериментального или клинического материала. Недопустимы фразы вроде «материал обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики». Для всех полученных статистических оценок параметров необходимо приводить их стандартные ошибки и/или доверительные интервалы. Пример ($27{,}9 \pm 0{,}47$; ${}_{27{,}46}27{,}9_{28{,}40}$). Значение p-value необходимо указывать точно, кроме случаев, когда $p < 0{,}001$. Единицы измерения даются в соответствии с Международной системой единиц — СИ.
10. **Колонтитул** должен содержать сокращенный заголовок, содержащий не более 40 знаков (включая пробелы) и нумерацию страниц.
11. **Иллюстрации и таблицы.** Таблицы, рисунки и подписи к рисункам предоставляются на отдельных страницах. Число рисунков не должно превышать пяти. Фотоснимки должны быть отпечатаны на белой глянцевой бумаге, присылаются в двух экземплярах, один из них без надписей и цифр. На обороте рисунков необходимо указать карандашом фамилии авторов и название статьи. В подписях под рисунками должны быть сделаны объяснения значений всех кривых, букв, цифр и прочих условных обозначений на том языке, на котором написана статья. Все графы в таблицах должны иметь заголовки. Сокращения слов в таблицах не допускаются. Не следует повторять одни и те же данные в тексте, на рисунках и в таблицах. Рисунки, схемы, фотографии должны быть представлены в расчете на печать в черно-белом виде или уровнями серого в точечных форматах tiff (tagged image file format 300–600 dpi), bmp, или в векторных форматах Adobe Illustrator (ai, eps). Иллюстрации должны быть приложены в отдельных файлах. При оформлении графических материалов учитывайте размеры печатного поля Журнала. Масштаб 1:1. Ширина: 18 см. Все возникшие вопросы по оформлению рисунков можно задать по e-mail: nl@n-l.ru.
12. **Библиография**

Список литературы составляется в алфавитном порядке, сначала русского, затем латинского алфавита. Если у статьи до 4 авторов, то они указываются все. Если авторов более четырех, то указывают первых трех, а далее следует «и др.». При указании нескольких статей одного автора их необходимо выстраивать в алфавитном порядке соавторов или названий. В тексте при ссылке на несколько работ сразу / при цитировании нескольких работ сразу они указываются в алфавитном порядке по фамилии автора.

Примеры цитирования в тексте: по данным Иванова с соавт. (1998), (Иванов и др., 1985), по данным Алроя с соавт. (Alroy et al., 2001), (Schiermeier, 2003), (Benton, 1999; Miller, 1998; Sepkoski, 1991a, 1991b, 1992).

13. **Образцы оформления литературных ссылок:**

Книга, однотомное издание:

Бердников В. А., 1978. Основные факторы макроэволюции. Новосибирск: Наука. 226 с.

Лутова Л. А., Проворов Н. А., Тиходеев О. Н. и др., 2000. Генетика развития растений / под ред. С. Г. Инге-Вечтомова. СПб.: Наука. 539 с.

Статья из книги:

Garte S., Sogava K., 1999. Ah-receptor gene polymorphisms and human cancer susceptibility // Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer / Eds. P. Vineis et al., Lyon.: IARC Scientific Publ. P. 149–158.

Статья из журнала:

Бочков Н. П., 2002. Вклад генетики в медицину // Журнал неврологии и психиатрии. Т. 3. № 2 (если нумерация стр. начинается в каждом номере). С. 3–15.

Hanway D., Chin J. K., Xia G et al., 2002. Previously uncharacterized genes in UV- and MMS-induced DNA damage response in yeast // PNAS. Vol. 99. P. 10605–10610.

Депонированная научная работа, авторское свидетельство:

Романов П. А., 1990. Способ определения популяционной принадлежности комодорских варанов // А. с. СССР. № 1536604 от 15.09.1989. Бюллетень № 2 от 15.01.1990.

Иванов В. П., 1986. Изучение широтного полиморфизма алкогольдегидрогеназы сибирских видов рода Juncus (Juncaceae). М., 1986. 24 с. Деп. в ВИНИТИ 18.12.86, № 78б–В86.

Автореферат диссертации:

Коровьев П. А., 1993. Принцип неопределенности при выборе полового партнера: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб, 30 с.

Тезисы доклада:

Mylnikov S. V., Oparina T. I., Khavinson V. Kh., 2002. Sex-dependent effects of peptides on life span and free radical oxidation in *Drosophila melanogaster* // Valencia forum, Book of abstracts, Spain, p. 26.

Интернет-документы.

Медведев Б. Н., Прокипец А. Т. Применение этилендиаминтетрауксусной кислоты в лечении лентовидной кератопатии // Офтальмология сегодня. 2008. URL: http://www.oftalm.ru/lentovid.html (дата обращения: 17.09.08).

VII ОБЪЕМ РУКОПИСЕЙ

Объем рукописи **обзорно-теоретической статьи** не должен превышать 30 стр. машинописного текста через два интервала, 12 кеглем (включая таблицы, список литературы, подписи к рисункам и резюме на английском языке), поля не менее 25 мм. Нумеруйте страницы последовательно, начиная с титульной.

Объем рукописи **статьи экспериментального характера** не должен превышать 20 стр. машинописного текста;

Объемы **других рукописей** не должны превышать:

кратких сообщений (писем в редакцию) — 7 стр.;

отчетов о конференциях — 3 стр.;

рецензий на книги — 3 стр.

VIII РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ

Рукописи, поступившие в **Редакцию**, направляются двум рецензентам. Если у рецензента возникают вопросы, то статья с комментариями рецензентов возвращается **Автору.** Датой принятия рукописи к печати считается дата получения **Редакцией** окончательного варианта рукописи. **Редакция** оставляет за собой право внесения в текст редакторских изменений, не искажающих смысла статьи (литературная и технологическая правка). При представлении рукописи в Журнал **Авторы** несут ответственность за раскрытие своих финансовых и других конфликтных интересов, способных оказать влияние на их работу. В рукописи должны быть упомянуты все лица и организации, оказавшие финансовую поддержку (в виде грантов, оборудования, лекарств и пр.), а также другое финансовое или личное участие.

IX АВТОРСКИЕ ЭКЗЕМПЛЯРЫ ЖУРНАЛА

Редакция обязуется выдать **Автору** 1 экз. Журнала с опубликованной рукописью. **Авторы**, проживающие в Санкт-Петербурге, получают авторский оригинал Журнала непосредственно в **Редакции**. Иногородним **Авторам** авторский оригинал Журнала высылается на адрес лица, ответственного за получение пробных оттисков и авторского оригинала Журнала.

АДРЕС РЕДАКЦИИ

Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034.
199034. Тел./факс: (812) 328-15-90,
e-mail: ecolgenet@list.ru.

Сайт редакции:
http://gene-on-gene.narod.ru.
Полная электронная версия — http://www.elibrary.ru.