

4. Wei Z. M., Laby R. J., Zumoff C. H., Bauer D. W., He S. Y. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora* // Science – 1992. – 257. – P. 85 – 88
5. Nissinen R.M. Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels//Molecular Plant Pathology.-2007.-Vol. 8, № 1.-P. 55–67
6. Лагоненко А.Л., Т.В.Овчинникова, Николайчик Е.А., Евтушенков А.Н. «Характеристика локализации белка HrpJ, компонента системы секреции III типа бактерий *Erwinia carotovora* subsp.atroseptica // Доклады НАН Б.- 2004.- Т. 48, №5.- С.65-69
7. Николайчик Е.А., Овчинникова Т.В., Валентович Л.Н., Губич О.И., Шолух М.В., Евтушенков А.Н. Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* в клетки *Nicotiana Tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности как необходимое условие // Доклады НАНБ.- 2005.- Т.49.- Стр.81-85.
8. Лагоненко А. Л., Николайчик Е. А., Евтушенков А. Н. Характеристика харпина HrpW бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*/ // Доклады НАН Беларуси. Т.50.-2006.-№1.-С.70-73.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике/Миллер Дж. – М.:Мир, 1976. – 436 с
10. Чернов С.П., Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Мацерация тканей клубней картофеля пектолитическими бактериями рода *Erwinia* // Прикладная биохимия и микробиология. - 1991. - Т.21. - С.885-889.
11. Collmer A. Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors// Trends Microbiol.-2002.-Vol. 10.-P. 462–46.

### Резюме

Изучали влияние мутаций по генам системы секреции III типа на вирулентность бактерий *Erwinia atroseptica*. Выявлено, что мутации по генам hrpN, hrpJ, dspE усиливали способность бактерий мацерировать ткани клубней картофеля, но не моркови.

We have investigated the effect of some gene mutations in type III secretion system on virulence activity of bacteria *Erwinia atroseptica*. It was established that, hrpN, hrpJ, dspE gene mutations increase bacterial ability in maceration of potato tuber tissue, while carrot root-crop was not affected by the same experience.

**КИРИКОВИЧ С.С., ДЕНИСОВА Ф.Ш., ЛЕВИТЕС Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

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

### ИМПРИНТИНГ В АГАМОСПЕРМНЫХ ПОТОМСТВАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Настоящее время характеризуется огромным вниманием исследователей к широкому классу явлений наследования и изменчивости, классифицируемым как менделевские.

Наряду с цитоплазматическим наследованием к менделевским относится также и наследование эпигенетических изменений, под которыми понимают изменения активности и экспрессии генов, возникающие в процессе индивидуального развития организма, не связанные с нарушением нуклеотидной последовательности ДНК и

сохраняющиеся в ряду клеточных и половых поколений [1]. Среди эпигенетических явлений значительную роль исследователи отводят родительскому импринтингу, при котором экспрессия аллеля зависит от того, какой гаметой, отцовской или материнской, он был привнесен в зиготу. Традиционно исследование импринтинга проводят на полученных половым путем реципрокных гибридах, в которых пара взятых в исследования растений используется одновременно и как отцовское, и как материнское.

Ранее нами было получено доказательство того, что импринтинг может проявляться не только в половых, но и в агамоспермных потомствах, полученных от пыльцестерильных растений сахарной свеклы в беспыльцевом режиме [2]. В этом случае импринтинг означает зависимость экспрессии генов не от родителей, а от прародителей по материнской линии. На основании этого логично использовать термин «импринтинг» без прилагательного «родительский».

В связи с накоплением данных о характере изменчивости при агамоспермии [3] возникла необходимость повторного рассмотрения выявленных ранее фактов импринтинга в агамоспермных потомствах сахарной свеклы.

### **Материалы и методы**

В качестве материала для исследования были взяты реципрокные гибриды, полученные от скрещивания растений из агамоспермных потомств KWS1-5A и КНВС2-10А, различающихся по аллельному составу ферментных локусов. Потомства KWS1-5A и КНВС2-10А были предоставлены С.И. Малецким, Е.И. Малецкой и Р. Крысинским. Гибриды KWS1-5A-1 × КНВС2-10А-4 были обозначены нами цифрой 2, а обратные гибриды КНВС2-10А-4 × KWS1-5A-1 были обозначены цифрой 12. Семена гибридов были посеяны в гидропонной теплице, а выращенные из них корни были проаровизированы и высажены на изолированных участках. Среди гибридов 2 и 12 были обнаружены стерильные, полустерильные и фертильные растения. Все растения, в которых был выявлен даже небольшой процент фертильной пыльцы, были либо удалены с поля, либо помещены под изоляторы. Так, например, было закрыто изолятором растение № 2-2 гибрида KWS1-5A-1 × КНВС2-10А-4 с неисследованным ms-фенотипом, и растение № 12-9 гибрида КНВС2-10А-4 × KWS1-5A-1 с единичными окрашенными пыльцевыми зернами. На изолированном участке открытыми были оставлены только растения, которые имели стабильное проявление фенотипа ms0 и ms1 по классификации Оуэна [4]. У одного из полустерильных растений (№ 12-3) для получения агамоспермных семян были кастрированы нераскрывшиеся бутоны с последующей изоляцией веточек пергаментными изоляторами. Все остальные части этого растения были закрыты бязевым изолятором. Таким образом, беспыльцевой режим был обеспечен изолированным положением участка, изоляцией отдельных растений и кастрацией нераскрывшихся бутонов. Для цитологического контроля уровня фертильности-стерильности растений готовили препараты пыльцы, окрашенной кармином.

В качестве маркерных признаков были выбраны изоферментные спектры алкогольдегидрогеназы (ADH1, E.C.1.1.1.1.), малик-фермента (ME1, E.C.1.1.1.40.), изоцитратдегидрогеназы (IDH3, E.C.1.1.1.42.), контролируемые соответственно локусами *Adh1*, *Me1* и *Idh3* [5-7]. Образцы подвергали горизонтальному электрофорезу в 14 % крахмальном геле с последующим гистохимическим окрашиванием электрофореграмм по стандартной методике [6, 8].

У растений, взятых для получения реципрокных гибридов, были определены генотипы по маркерным локусам. Генотипы эти следующие:

KWS1-5A-1 : *Adh1-F/Adh1-S*, *Me1-F/Me1-F*, *Idh3-F/Idh3-S*

КНВС2-10А-4 : *Adh1-F/Adh1-F*, *Me1-F/Me1-S*, *Idh3-F/Idh3-F*

Вероятности сходства и различий соотношений фенотипических классов оценивали по G-критерию [9].

### Результаты и обсуждение

В агамоспермных потомствах реципрокных гибридов был выявлен полиморфизм по всем трем маркерным ферментам ADH1, ME1, IDH3. В табл. 1 показано соотношение фенотипов по ферментным локусам в потомствах, полученных от индивидуальных растений.

Таблица 1

**Соотношение фенотипических классов по маркерным ферментам в агамоспермных потомствах, полученных от реципрокных гибридов: KWS1-5A-1 × KHBC2-10A-4 (гибрид-2) и KHBC2-10A-4 × KWS1-5A-1 (гибрид-12)**

Фермент	№2-2, Ферт.(?) •	№2-5, ms0	№2-9, ms0
	FF-FS-SS	FF-FS-SS	FF-FS-SS
ADH1	16-26-13	46-39-0	13-21-7
ME1	46-9-0	29-29-16	13-26-2
IDH3	25-0-0	38-46-0	37-1-0

Фермент	12-3, кастр, •	12-8, ms1	12-9, ms1, •	12-11, ms1
	FF-FS-SS	FF-FS-SS	FF-FS-SS	FF-FS-SS
ADH1	8-6-3	37-0-0	37-0-0	9-4-0
ME1	17-0-0	29-33-15	9-18-10	8-5-0*
IDH3	7-6-3	15-33-23	8-23-5	7-6-0

• – семена получены под изолятором; \* – два фенотипа – FF и FC объединены в один фенотипический класс FF.

В потомстве гибридного растения № 2-2 были выявлены только два фенотипических класса по ME1. Это может свидетельствовать о том, что потомство растения № 2-2 формировалось путем митотической агамоспермии. Диморфизм представляет собой наглядное проявление неменделевской изменчивости, поэтому соотношение фенотипов по ADH1 в данном потомстве также можно рассматривать как результат неменделевской изменчивости.

Полученные нами данные по характеру изменчивости в агамоспермных потомствах [3] позволяют утверждать, что даже при соотношениях фенотипических классов, совпадающих с соотношением 1 : 2 : 1, в основе полиморфизма лежит неменделевская изменчивость. Именно поэтому полиморфизм ферментов, наблюдаемый в данном эксперименте в других агамоспермных потомствах, рассматривается как проявление неменделевской изменчивости.

Для того чтобы сопоставить соотношения фенотипов в прямом и обратном гибридах проведено суммирование только полиморфных соотношений по каждому ферменту в пределах каждой группы потомств. Суммарные соотношения фенотипов по ME1 и IDH3 в реципрокных потомствах, различаются значимо ( $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  соответственно) (табл. 2). Представленные факты реципрокных различий в соотношении фенотипов исследованных ферментов можно рассматривать как проявление импринтинга.

Таблица 2

**Сравнение суммарных соотношений фенотипов в агамоспермных потомствах реципрокных гибридов: KWS1-5A-1 × KHBC2-10A-4 (Гибрид-2) и KHBC2-10A-4 × KWS1-5A-1 (Гибрид-12)**

Фермент	Гибрид-2	Гибрид-12	G	P
	FF-FS-SS	FF-FS-SS		
ADH1	75-86-20	17-10-3	2,5324	>0,05
ME1	88-64-18	46-56-25	8,8194	<0,05
IDH3	75-47-0	37-68-31	59,2236	<0,001

P – Вероятность сходства соотношений.

В настоящее время предложена модель механизма, определяющего полиморфизм в потомствах, полученных путем митотической агамоспермии [10, 11]. В основе этой модели лежит предположение об эндоредупликации хромосом в клетках тканей семяпочки и об удалении избыточных копий хроматид из клетки, переходящей к эмбриональному развитию. Согласно предложенной модели потеря избыточных копий хроматид происходит случайным равновероятным образом на основе комбинаторного процесса, в результате которого из множества копий хроматид, присутствовавших в клетке до ее вступления в эмбриогенез, остаются в начавшей эмбриональное развитие клетке (в апозиготе, обозначаемой сокращенно как APZ) только две. В силу того, что в каждой хромосоме эукариот имеется много независимых точек начала эндоредупликации и разные участки одной и той же хромосомы могут иметь разную степень эндоредупликации, предполагается, что потеря избыточного количества ДНК может происходить не целыми хроматидами, а независимо отдельными участками [10, 11].

Соотношение фенотипических классов в агамоспермном потомстве определяется соотношением числа нитей хроматид в районах гомологичных хромосом, несущих аллели гетерозиготного маркерного локуса. Недостаток какого-либо гомозиготного фенотипического класса в агамоспермном потомстве может быть обусловлен тем, что в каждой из клеток, готовящихся к эмбриогенезу (обозначенных как Pro-APZ), соответствующий аллель ферментного локуса присутствует в меньшем числе хроматид. Тот факт, что соотношения фенотипических классов, выявляемые в агамоспермных потомствах реципрокных гибридов, достоверно различаются, позволяет предположить, что аллели маркерных ферментных локусов редуцированы в клетках реципрокных гибридов в разной степени.

Отсутствие достоверных различий по ADH1 у потомств реципрокных гибридов (табл. 1) позволяет сделать вывод о том, что у данной пары гибридных растений достаточно близка степень эндоредупликации соответствующих аллелей локуса *Adh1*.

Предположение о влиянии степени эндоредупликации участков хроматид, несущих аллели маркерных генов, на соотношение фенотипических классов в агамоспермных потомствах хорошо согласуется с выводами о том, что импринтинг представляет собой отражение дозовых взаимодействий геномов и отдельных генов [12, 13].

### **Выводы**

Проведено изучение частот фенотипов ферментов в агамоспермных потомствах, полученных от реципрокных гибридов сахарной свеклы. Выявлены различия в частоте фенотипических классов малик-фермента и изоцитратдегидрогеназы в потомствах реципрокных гибридов, в то время как по алкогольдегидрогеназе достоверных различий не обнаружено. Предполагается, что различия в частоте фенотипических классов в исследованных потомствах представляют собой проявление импринтинга и определяются существующими у реципрокных гибридов различиями в степени эндоредупликации аллелей ферментных локусов в клетках, готовящихся к эмбриогенезу.

### **Литература**

1. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // *Genes and Development*. - 2002. - vol. 16, № 1. - P. 6-21.
2. Levites E.V., Kirikovich S.S., Denisova F.Sh. Expression of enzyme genes in agamosperous progenies of reciprocal hybrids of sugar beet // *Sugar Tech*. - 2001. vol. 3, № 4. - P. 160-165.

3. *Levites E.V., Kirikovich S.S.* Natural genetic sampling: a new approach to the study of agamospermy in pollen-sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants // Sugar Tech. - 2005. - vol. 7, № 4. - P.145-149.
4. *Owen F.W.* Inheritance of cross- and self-sterility in *Beta vulgaris* L. // J. Agric. Rec. - 1942. - vol. 1. - P.679-698.
5. *Малецкий С.И., Коновалов А.А.* Наследование алкогольдегидрогеназы у сахарной свеклы. Сообщение 1. Анализ отклонения от моногенного расщепления // Генетика. - 1985. - т. 21, № 9. - С. 1527-1540.
6. *Левитес Е.В.* Генетика изоферментов растений. - Новосибирск: Наука. - 1986. - 144с.
7. *Levites E.V., Garifullina F.Sh.* Use of isozymes as genetic markers for identification of sugar beet varieties // Biochemical Identification of Varieties: Materials of the 3th International Symposium ISTA. - Leningrad, USSR. - 1988. P.104-109.
8. *Meizel S., Markert C.L.* Malate dehydrogenase isozymes of the marine snail *Ilyanassa obsoleta* // Arch. Biochem. Biophys. - 1967. - vol. 122. - P. 753-765.
9. *Weber E.* Grundriss der biologischen statistic. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. - 1986. - 652 p.
10. *Levites E.V.* Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // Sugar Tech. - 2005. - vol. 7, № 2-3. - P. 67-70.
11. *Levites E.V.* Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants // on-line: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>
12. *Lin B.-Y.* Ploidy barrier to endosperm development in maize // Genetics. - 1984. - vol. 107. - P. 103-115.
13. *Kermicle J.L.* Location, time of action, and dominance relations of an imprintor gene of R-mottled in maize // Modification of Gene Expression and non-Mendelian Inheritance / Eds Ono T., Takaiwa F. Tokio: Nation. Inst. Agrobiol. Res. - 1995. - P. 119-134.

#### **Резюме**

Выявлен импринтинг в агамоспермных потомствах, полученных от реципрокных гибридов сахарной свеклы. Импринтинг проявляется как различия в частоте фенотипических классов в потомствах реципрокных гибридов и определяется существующими у реципрокных гибридов различиями в степени эндоредупликации аллелей ферментных локусов в клетках, готовящихся к эмбриогенезу.

This study identifies imprinting in the agamospermous progenies generated from reciprocal sugar beet hybrids. Imprinting was observed as variations in the frequency of different phenotypes in the progenies of reciprocal hybrids. This was due to variations in the degree of endoreduplication of the enzymatic allele loci, in cells entering embryogenesis.

**КОНОВАЛОВ В.С., ПЕТРЕНКО И.П., ГАВРИЛЕНКО Н.С., БЕЛЫЙ Ю.А., ШИБУНЬКО М.В.**

*Институт разведения и генетики животных УААН,*

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

#### **К ВОПРОСУ О ТЕНДЕНЦИЯХ РАЗВИТИЯ СЕЛЕКЦИОННОГО МЕЛАНИЗМА СРЕДИ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ СТАД ЧЕРНО-ПЕСТРОГО СКОТА**

На пороге XXI века мы встречаемся с удивительным и поучительным примером саморегуляторного преобразования генофонда высокопродуктивных пород различных видов домашних животных. Наиболее наглядно это выражено у высокопродуктивных стадах голштинской породы.