

Література

1. Методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин / М.В. Зубець, В.П. Буркат, Ю.Ф. Мельник та ін., Наук. ред. І.В. Гузев.- К.: Аграрна наука: 2007.-120 с.
2. Сохранение генетических и уникальных видов животных / В.А. Багиров, Л.К. Эрнст, П.М. Кленовицкий, Н.А. Зиновьева //Цитология. - 2004.-Т. 46.- № 9, .-С.767-768.
3. Improving cryopreservation systems / G. Vajta, M. Kuwayama // Theriogenology.- 2006.- Vol.65, I.1.- P.236-244.
4. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных: Монография / Л.В.Горбунов, Л.П. Бучацкий - К.: Издательско-полиграфический центр “Киевский университет”, 2005.- 325 с.: ил., табл.- Библиогр.: с. 317-322.
5. Вплив різних криопротекторів та їх сумішей на морфокінетичні характеристики сперміїв людини / В.І. Грищенко, Н.Н. Чуб, В.Л. Родіонова та ін. // Науково-технічний бюлетень: Зб. наук. праць.- Харків, 2008.- № 96.- С. 130-137.
6. The relationship of swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity / R.J. Blandau, R.E. Rumery // Fertil. Steril.- 1964. № 15.- P 571-579.
7. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm / Н. К. Ikeda, J. Kikuchi, Н. Noguchi et al. //Theriogenology.- 2002.-V.57.-P. 1309-1318.

Резюме

Обсуждается эффективность использования эпидидимальных сперматозоидов быков и хряков для сохранения генофонда и использования в биотехнологических исследованиях. Установлена эффективность применения эндо- и экзоцеллюлярных криопротекторов в витрификационном растворе для замораживания ооцит-кумулюсных комплексов коров.

It is discussed effects of using bull and board epididymal spermatozoa in preservation of gene pool and biotechnology investigation. It is investigated efficiency of application intracellular and outside cellular crioprotectors in vitrification solution for bovine oocytecumulus complexes freezing.

ЭЛЬКОНИН Л.А., КОЖЕМЯКИН В.В., ЦВЕТОВА М.И.

*ГНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии,
Россия, 410010, Саратов, ул. Тулайкова, 7, e-mail: elkonin@mail.saratov.ru*

НАСЛЕДУЕМАЯ АКТИВАЦИЯ ГЕНОВ-ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ УСЛОВИЯМИ ВЫРАЩИВАНИЯ РАСТЕНИЙ КАК МЕХАНИЗМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ В ЦМС-ИНДУЦИРУЮЩЕЙ ЦИТОПЛАЗМЕ ТИПА «9Е» У СОРГО

Наследуемые изменения генной активности, возникающие в онтогенезе растений и происходящие без изменений последовательности ДНК, относятся к числу наиболее интригующих явлений генетики, составляя сферу эпигенетики растений [1]. Известно, что подобные эпигенетические явления весьма чувствительны к условиям внешней среды и возникают как ответ на действие конкретных факторов. Так, у кукурузы температура или длина фотопериода влияют на индукцию парамутаций в генах, контролирующих окраску зерновки [2]. К сожалению, подобные эффекты для многих генетических систем растений изучены чрезвычайно слабо, в том числе, и для систем, контролирующую цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС).

Нами в течение ряда лет проводилось исследование линий сорго с ЦМС типа «9Е» и генетически близкими к нему типами А4 и «М35-1А» [3,4]. В результате этих исследований было выявлено крайне необычное явление. Ген-восстановитель,

проявлявшийся в F_1 и, следовательно, являвшийся доминантным геном, не передавался через пыльцу и не восстанавливал фертильность ни гибридов с другими ЦМС-линиями с тем же типом цитоплазмы, ни гибридов с исходной ЦМС-линией. Вместе с тем, фертильность стабильно наследовалась при самоопылении фертильных гибридов (вплоть до F_8). Для объяснения этого явления нами была выдвинута гипотеза об изменении типа цитоплазмы под влиянием генов-восстановителей [5]. Однако эта гипотеза не получила экспериментального подтверждения; в то же время были получены косвенные данные, указывавшие на зависимость уровня мужской фертильности гибридов F_1 от влагообеспеченности растений на этапе развития генеративной сферы [4].

В данной работе сообщаются результаты экспериментов по проверке гипотезы о наследуемой активации генов-восстановителей у гибридов F_1 условиями окружающей среды (влагообеспеченностью и длиной фотопериода) и наследовании «включенных» генов в самоопыленном потомстве фертильных гибридов и в тест-кроссах с ЦМС-линиями на цитоплазме «9E» при выращивании в неиндуктивных условиях.

Материалы и методы

В работе использовали ЦМС-линии [9E]Желтозерное-10 ([9E]Ж-10), [9E]Пищевое-614 и [9E]Тх398; в качестве восстановителей фертильности служили фертильная линия в цитоплазме «9E», КВВ-263, которая была получена в результате самоопыления гибрида F_1 [9E]Тх398/КВВ-112, сортообразец Перспективное-1 (П-1) и линия КВВ-34, несущая ядерные гены эуплазматической линии-донора цитоплазмы «9E».

Для проверки гипотезы о наследуемой активации генов-восстановителей под влиянием внешней среды одни и те же гибриды F_1 , F_2 и BC_1 , полученные от скрещивания линий-восстановителей с разными ЦМС-линиями, выращивали одновременно на разных участках при разном режиме влагообеспеченности: в условиях дополнительного регулярного полива (50 л/м^2 начиная со стадии формирования трубки) и «засушника», изготовленного из прозрачного поликарбоната и установленного на делянку на стадии трубкования растений. В опытах по влиянию длины фотопериода растения на ранних этапах онтогенеза (до стадии 5-6 листьев) закрывали темными вегетационными сосудами; контрольные растения выращивали на этой же делянке без укрывания.

Уровень мужской фертильности определяли по степени завязываемости семян под изоляторами. При этом растения классифицировали как стерильные (0-2%), полустерильные (<40%, чаще – 10-15%), полуфертильные (40-80%,) и фертильные (>80%).

Для цитологического исследования развития пыльцы метелки фиксировали в ацетоалкоголе (1:3), промывали и хранили в 75% спирте. Для окраски использовали ацетокармин (2%). Давленные препараты из пыльников готовили с использованием смеси 45% уксусной кислоты и 70% хлоралгидрата (1:1), подкрашенной ацетокармином.

Результаты и обсуждение

Результаты анализа гибридных популяций, выращивавшихся параллельно в условиях «засушника» и дополнительного полива, свидетельствуют, что уровень влагообеспеченности растений на этапе формирования генеративной сферы регулирует экспрессию генов-восстановителей на цитоплазме «9E». При этом резкие различия по уровню фертильности наблюдаются, главным образом, у гибридов F_1 и BC_1 (тест-кроссов), в которых гены-восстановители находятся в гетерозиготном состоянии, тогда как в F_2 в большинстве гибридных комбинациях условия влагообеспеченности не оказывают столь резкого влияния на экспрессию генов-восстановителей. Эти данные доказывают, что неканонический характер наследования восстановления фертильности на стерильной цитоплазме «9E» (стабильное наследование при самоопылении гибридов

F₁, но стерильность их тест-кроссов с ЦМС-линиями), по-видимому, обуславливается высокой чувствительностью гетерозиготы Rf^{9E}/rf^{9E} к уровню влагообеспеченности. Гомозигота Rf^{9E}/Rf^{9E} не проявляет такой зависимости, в результате чего самоопыленное потомство гибридов F₁ оказывается фертильным даже в засухе.

Так, в комбинации [9E]Ж-10/КВВ-263 гетерозигота по генам-восстановителям в условиях «засушника», как показывает анализ гибридов F₁, имеет почти полностью стерильный фенотип. Однако в F₂, полученном от полустерильных растений F₁, выращенных при дополнительном поливе, соотношение фертильных и стерильных форм соответствовало доминантному характеру экспрессии генов-восстановителей.

Для объяснения данного явления нами выдвигаются две гипотезы:

(1) Существует эпигенетический механизм, регулирующий взаимодействие аллелей в ядерных локусах, контролирующих восстановление фертильности на цитоплазме 9E, который чувствителен к уровню влагообеспеченности растений. Поскольку, в соответствии с современными данными [6], функциональным аллелем является ген-восстановитель, подавляющий экспрессию митохондриальных генов, вызывающих ЦМС, то, возможно, в условиях засухи ген-восстановитель не способен эффективно функционировать и проявляется как рецессивный, тогда как во влажных условиях – как доминантный. В результате «включения» в F₁ и последующего самоопыления ген-восстановитель переходит в гомозиготное состояние, и такие гомозиготы в F₂ оказываются фертильными даже в условиях засухи;

(2) Возможно, доминантный статус гена-восстановителя обуславливается эпигенетическими изменениями, возникающими в F₁ под действием достаточного режима увлажнения. Этот статус наследуется при самоопылении и проявляется в F₂ и в последующих поколениях при самоопылении, однако в новом гибридном геноме – в F₁ или в BC₁ (тест-кроссе) – он устанавливается *de novo* и только при наличии оптимального уровня влагообеспеченности.

Следует отметить, что даже в условиях дополнительного полива гибриды F₁ [9E]Ж-10/КВВ-263 проявляли значительно более низкий уровень фертильности, нежели [9E]Тх398/КВВ-263. В то же время, различия по уровню фертильности между гибридами [9E]Ж-10/П-1 и [9E]Тх398/П-1 отсутствовали. По видимому, в геноме [9E]Ж-10 имеются дополнительные ядерные гены, участвующие в контроле ЦМС типа «9E», супрессия которых достигается только при скрещивании с линией П-1, но не с линией КВВ-263. Эти данные показывают, что восстановление фертильности у разных ЦМС-линий на цитоплазме «9E» требует разных генов-восстановителей. Данный факт свидетельствует в пользу гипотезы, что в ЦМС типа «9E» стерильный фенотип обуславливается не только цитоплазматическими ЦМС-индуцирующими генами, как у большинства известных типов ЦМС, но и ядерными «плазмон-чувствительными» генами, усиливающими стерилизующий эффект цитоплазмы. В пользу этой гипотезы также свидетельствуют данные о разном характере расщепления в F₂ у гибридов разных ЦМС-линий на цитоплазме «9E» с одной и той же линией-восстановителем фертильности.

Обращает на себя внимание отсутствие выщепления стерильных форм в F₂ в потомстве гибридов F₁ [9E]Тх398/П-1 и в их тест-кроссе с ЦМС-линией [9E]Ж-10 в условиях «влажника», не наблюдающееся в условиях «засушника». Этот факт может быть объяснен большим числом генов-восстановителей у П-1, функционирующих в условиях «влажника» (возможно, «включением» дополнительных генов), при котором для выявления рецессивных гомозигот требуется большая популяция F₂.

Анализ фертильности гибридных популяций F₁ [9E]Пищевое-614/КВВ-34, выращивавшихся на ранних стадиях развития в условиях короткого или длинного светового дня (соответственно, КД и ДД), свидетельствуют о том, что сокращение длины фотопериода на фотопериодически-чувствительной стадии онтогенеза значительно увеличивает число фертильных и снижает число полностью стерильных

растений в F₁. Примечательно, индукция экспрессии генов-восстановителей в F₁ носит наследственный характер и ведет к увеличению доли фертильных растений в F₂, выращивавшемся в условиях естественного освещения (КД→ДД), по сравнению с контролем (потомством гибрида F₁, выращивавшемся в условиях длинного дня, ДД→ДД). Возможно, при коротком фотопериоде происходит активация дополнительных генов-восстановителей, которые, будучи «включенными», функционируют и в условиях длинного фотопериода.

Такая чувствительность генов-восстановителей к длине фотопериода, возможно, связана с тем, что донором этих генов являлся тропический образец, IS12603 – донор цитоплазмы «9E», адаптированный к условиям КД, и для их «включения» необходим некоторый индуктор, преимущественно накапливающийся в условиях КД. Наследование «активного» состояния генов-восстановителей в F₂, выращенном в условиях естественного светового дня, подтверждает гипотезу о существовании эпигенетического механизма, «включающего» гены-восстановители в F₁ при наличии оптимальных условий внешней среды, и наследовании установленного функционального статуса этих генов в самоопыленном потомстве [4].

Цитологический анализ микроспорогенеза показал, что у изученных ЦМС-линий ≈90% микроспор и 95-100% пыльцевых зерен (ПЗ) на стадии, предшествующей миграции вегетативного ядра, имели нормальную морфологию на уровне световой микроскопии. В период гаметогенеза и накопления крахмала возникало множество различных типов нарушений: наблюдались ПЗ с полностью дегенерировавшим содержимым, с задержкой развития на стадии одно- и двуядерного гаметофита, нарушениями в накоплении крахмала. Отдельную группу составляли ПЗ с разъединением интины и экзины, причем на интине развивались элементы поры. Наблюдались ПЗ неправильной формы, но полностью заполненные крахмалом. Тем не менее, 3-9% ПЗ у линии [9E]Ж-10 были внешне нормальными. У линии [9E]Тх398 количество внешне нормальных ПЗ составляло 30%. Спектр аномалий у обеих линий одинаков.

У гибридов F₁ сохранялся спектр аномалий ПЗ, присутствовавших у материнских ЦМС-линий. Вместе с тем, у гибридов F₁ [9E]Ж-10/Перспективное-1 количество фертильных ПЗ значительно возрастало, по сравнению с материнской линией, в отличие от гибридов [9E]Ж-10/КВВ-263. У гибридов F₁ на основе [9E]Тх398 количество полностью окрашенных ПЗ не возрастало, однако завязываемость семян, при наличии генов-восстановителей Перспективного-1 оказалась 100%-ной, а под действием генов-восстановителей КВВ-263 варьировала почти от нуля до 80%. У самой линии КВВ-263, полностью фертильной, уровень фертильных ПЗ составлял 50%.

Выводы

1. «Включение» генов-восстановителей ЦМС-индуцирующей цитоплазмы типа «9E» регулируется условиями окружающей среды: влагообеспеченностью на этапе формирования метелки и коротким световым днем на фотопериодически-чувствительной стадии онтогенеза растений. Такая «активация» носит наследуемый характер и сохраняется в самоопыленном потомстве гибридов F₁.
2. Восстановление фертильности у разных ЦМС-линий на цитоплазме «9E» требует разных генов-восстановителей, поскольку степень стерилизующего эффекта данной цитоплазмы зависит от ядерного генома ЦМС-линии.
3. Изученные гены-восстановители оказывают только частичный эффект на формирование фертильной пыльцы, при этом в геноме [9E]Тх398 они не повышают долю фертильных ПЗ (с «нормальным» фенотипом) (30%), но восстанавливают их оплодотворяющую способность, а в геноме [9E]Ж-10 увеличивают долю «нормальных» ПЗ до уровня [9E]Тх398.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 06-04-49119.

Литература

1. Grant-Downton R.T., Dickinson H.G. Epigenetics and its Implications for Plant Biology. 1. The Epigenetic Network in Plants // *Annals of Botany*.- 2005.- vol. 96.- P.1143-1164.
2. Mikula S. Environmental programming of heritable epigenetic changes in paramutant *r*-gene expression using temperature and light at a specific stage of early development in maize seedlings // *Genetics*.- 1995.- vol. 140.- P.1379-1387.
3. Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Nuclear-cytoplasmic interactions in restoration of male fertility in the '9E' and A4 CMS-inducing cytoplasm of sorghum // *Theor. and Appl. Genet.*- 1998.- vol. 97.- P. 626-632.
4. Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Influence of water availability on fertility restoration of CMS lines with the 'M35', A4 and '9E' CMS-inducing cytoplasm of sorghum // *Plant Breeding*.- 2005.- vol.134.- P.565-571.
5. Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V. Cytoplasmic reversions as a possible mechanism of male-fertility restoration in the '9E' CMS-inducing cytoplasm of sorghum // *Intern. Sorghum and Millet Newslett.*- 2000.- № 41.- P. 30-31.
6. Chase C.D., Gabay-Laughnan S. Cytoplasmic male sterility and fertility restoration by nuclear genes. In: H. Daniell, C.D. Chase (eds.) *Molecular biology and biotechnology of plant organelle*. Springer. Netherlands. 2004. P.593-621.

Резюме

Установлено, что экспрессия генов-восстановителей у гибридов F₁ сорго на стерильной цитоплазме «9E» активируется высоким уровнем влагообеспеченности в период развития метелки, а также коротким фотопериодом на ранней стадии онтогенеза растений. Будучи «включенными» гены-восстановители сохраняют активный (доминантный) статус при самоопылении и выращивании в «неиндуктивных» условиях.

Встановлено, що експресія генів-відновників у гібридів F₁ сорго на стерильній цитоплазмі «9E» активується високим рівнем вологозабезпеченості на період розвитку суцвіття, а також коротким фотоперіодом на ранній стадії онтогенезу рослин. «Вмикаючись», гени-відновники зберігають активну (домінантну) позицію при самозапиленні і вирощуванні в «неіндуктивних» умовах.

Expression of fertility restoring genes in the F₁ sorghum hybrids with the '9E' CMS-inducing cytoplasm was shown to be activated by high level of water availability at panicle development or short photoperiod at the early stage of plant development. Being 'switched on' fertility restoring genes maintain their active (dominant) status in self-pollinated progenies grown at 'non-inductive' conditions.

**ЯМСКОВА В.П.¹, СКРИПНИКОВА В.С.², КРАСНОВ М.С.¹, БИТКО С.А.²,
БЕРЕЗИН Б.Б.², ЯМСКОВ И.А.²**

¹*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова 26, e-mail: embrmsk@mail.ru*

²*Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова 28*

МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, ДЕЙСТВУЮЩИХ В МИКРОДОЗАХ

Нами были исследованы регуляторные белки (РБ), выделенные из тканей заднего отдела глаза крупного рогатого скота (сетчатки, пигментного эпителия, стекловидного тела, радужки, цилиарного тела) (Краснов и др., 2003а, б; Скрипникова