Государственное научное учреждение

«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ТОМ 13

Издается с 2005 года Выходит два раза в год **Молекулярная и прикладная генетика**: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Право и экономика, 2012. — 150 с. — ISSN 1999-9127.

В сборнике научных трудов публикуются обзорные и экспериментальные статьи в области молекулярной и прикладной генетики растений, микроорганизмов, животных, человека, отражающие исследования генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется наиболее актуальным проблемам геномики, генетической и клеточной инженерии. Публикуются результаты изучения генетических основ селекции растений, животных и микроорганизмов, разработки эффективных биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, охраны окружающей среды, биобезопасности.

Сборник предназначен для специалистов, работающих в области генетики, преподавателей, аспирантов и студентов ВУЗов биологического, сельскохозяйственного и медицинского профиля.

Редакционная коллегия:

А.В. Кильчевский – главный редактор, Л.В. Хотылева – зам. главного редактора; К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.П. Ермишин, М.А. Кадыров, Н.В. Казаровец, Н.А. Картель, А.И. Ковалевич, Г.И. Лазюк, В.А. Лемеш, С.А. Лихачев, Н.П. Максимова, С.Б. Мельнов, М.Е. Михайлова, И.Б. Моссэ, М.Е. Никифоров, В.Е. Падутов, В.Н. Решетников, Е.А. Сычева, В.В. Титок, И.П. Шейко, О.Н. Харкевич – члены редколлегии; И.В. Широкая – ответственный секретарь.

Рецензенты:

Л.В. Хотылева, академик, д.б.н., проф., ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»; Н.А Картель, академик д.б.н., проф., ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»; С.И. Гриб, академик д.с-х.н., проф., РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

УДК [577.21 + 575] (082) ISSN 1999-9127

СОДЕРЖАНИЕ

Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш, М.В. Богданова Морфо-генетический полиморфизм популяций льна-долгунца (Linum usitatissimum L.), сформированных на основе ложных трансформантов
И.Б. Моссэ, А.Л. Гончар, К.В. Жур, Н.И. Моссэ, Л.А. Кундас, Н.И. Бышнёв, П.Н. Малашевич, А.В. Семеняков Сравнение генотипов спортсменов разной специализации по комплексу генов спортивной успешности
А.В. Кондратюк, А.В. Кильчевский, Е.И. Кузьминова Анализ полиморфизма микросателлитных локусов сортов картофеля белорусской и иностранной селекции
Е.В. Белая, М.Е. Михайлова, Н.В. Батин Оценка индивидуального фенотипического эффекта полиморфных вариантов генов гипофизарного фактора роста-1 (bPit-1) и инсулиноподобного фактора роста-1 (bIGF-1) на признаки молочной продуктивности у черно-пестрого голштинизированного крупного рогатого скота 3
Е.В. Белая, М.Е. Михайлова, Н.В. Батин Комбинированные фенотипические эффекты полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада (bPit-1, bPrl, bGH, bGHR И bIGF-1) на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы
<i>И.С. Гордей, Н.Б. Белько, И.С. Щетько, И.А. Гордей</i> Генетические эффекты дупликации генома у озимой ржи (<i>Secale cereale</i> L.)
Ю.В. Полюхович, Е.В. Воронкова, А.В. Савчук, А.П. Ермишин Характеристика гибридов между 2 EBN видом-посредником Solanum verrucosum и 1 EBN диплоидными видами картофеля
Е.А. Ровба, О.Ю. Конева, С.Е. Дромашко Оценка генетического разнообразия пород карпа белорусской селекции с помощью микро сателлитных маркеров
Н.В. Савина, Т.Д. Кужир Параметры нормального ответа лимфоцитов на повреждения ДНК: референтные интервалы
В.И. Лукша, Е.В. Воронкова, О.Н. Гукасян, А.П. Ермишин Оценка первичных дигаплоидов <i>S. tuberosum</i> на наличие генов устойчивости к болезням вредителям методом ПЦР-анализа

О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская, П.В. Кузмицкая, Н.А. Картель Ассоциация аллеля <i>MdMYB1-1</i> с красной окраской кожицы плодов яблони	88
А.А. Булойчик, Е.А. Волуевич, В.С. Борзяк Изучение донорских свойств у группы сортов мягкой пшеницы – источников устойчивости Septoria nodorum Berk.	
П.М. Морозик, И.Б. Моссэ, М.Д. Амельянович, Э.В. Руденко, В. Алекна, М. Тамулайтене Молекулярно-генетические механизмы предрасположенности к остеопорозу	100
М.И. Лесюк, О.Ю. Конева, Е.А. Ровба, А.М. Слуквин Молекулярно-генетические исследования производителей стерляди (Acipenser ruthenus L.)	110
А.С. Сапун, О.В. Квитко, И.И. Конева, Я.И. Шейко, Н.А. Балашенко, С.Е. Дромашко Спонтанная иммортализация фибробластов крысы при длительном культивировании in vitro	118
О.В. Квитко, А.С. Сапун, И.И. Конева, Я.И. Шейко, Н.А. Балашенко, С.Е. Дромашко Биологические эффекты экзогенных полинуклеотидов и перспективы их использования в медицине (обзорная статья)	
Рефераты	136
Правила оформления статьи	147

CONTENTS

Ye. Guzenko, V. Lemesh, M. Bogdanova Morphogenetic polymorphism of fiber flax population (<i>Linum usitatissimum</i> L.) created on the base of "escapes"
I. Mosse. A. Gonchar, K. Zhur, N. Mosse, L. Kundas, N. Byshnev, P. Malashevich, A. Semenyakov A genotype comparison of different specialization sportsmen by sport gene complex
A. Kandratiuk, A. Kilchevsky, E. Kusminova Analysis of microsatellite locus polymorphism in potato cultivars of Belarusian breeding 25
E. Belaya, M. Mikhailova, N. Batin Estimation of the individual phenotypic effects of polymorphic variants of hypophysial growth factor (bPit-1) and of insulin-like growth factor-1 (bIGF-1) genes on milk productivity traits in cattle of Holstein and Black-and-white breeds
E. Belaya, M. Mikhailova, N. Batin Combined phenotypic effects of polymorphic gene variants of somatotropin cascade (bPit-1, bPrl, bGH, Bghr and b1GF-1) on milk productivity traits in cattle of Holstein breed
I. Gordey, N. Belko, I. Shetko, I. Gordey Genetic effects of duplication genome in winter rye
Yu. Polyukhovich, E. Voronkova, A. Savchuk, A. Yermishin Characteristics of diploid hybrids between 2 EBN bridge-species Solanum verrucosum and 1 EBN diploid potato species
E. Rouba, A. Koneva, S. Dromashko Estimation of genetic diversity for Belarusian carp breeds using microsatellite markers64
N. Savina, T. Kuzhir Parameters of a normal DNA damage response in lymphocytes: reference ranges
V. Luksha, E. Voronkova, O. Gukasian, A. Yermishin Estimation S. tuberosum primary dihaploids on possession of disease and pest resistance genes by means of PCR analysis
O. Urbanovich, P. Kuzmitskaya, Z. Kozlovskaya, N. Kartel Association MdMYR1-1 allele with apple fruit skin color

A. Buloichik, E. Voluevich, V. Borzyak Study of donor properties of common wheat cultivars that are source of resistance to Septoria nodorum Berk.	
P. Marozik, I. Mosse, M. Ameliyanovich, E. Rudenko, V. Alekna, M. Tamulaitienė Molecular and genetic mechanisms of predisposition to osteoporosis	100
M. Lesyk, O. Koneva, E. Rouba, A. Slukvin Molecular and genetic studies in population of sterlet spawners	110
A. Sapun, O. Kvitko, I.Koneva, Y. Sheiko, N. Balashenko, S. Dromashko Spontaneous immortalization of rat fibroblasts during prolonged cultivation in vitro	118
O. Kvitko, A. Sapun, I. Koneva, Y. Sheiko, N. Balashenko, S. Dromashko Biological effects of exogenous polynucleotides and prospects for their use in medicine	126
Summaries	136
Instructions to authors	147

Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш, М.В. Богданова

МОРФО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*LINUM USITATISSIMUM* L.), СФОРМИРОВАННЫХ НА ОСНОВЕ ЛОЖНЫХ ТРАНСФОРМАНТОВ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Клетки в культуре *in vitro* отличаются по морфологии, биохимическим свойствам, физиологическому и генетическому состоянию. Разнообразие (вариабельность) среди клеточных линий или растений-регенерантов называют сомаклональной вариабельностью. Генетическая природа и механизм возникновения сомаклональной изменчивости пока мало изучены. Однако можно четко выделить зависимость возникновения сомаклональных вариантов, прежде всего, от гетерогенности соматических клеток исходного экспланта, генетической и эпигенетической изменчивости, индуцируемой условиями культивирования *in vitro*, а также от генотипа и вида экспланта.

Исследования сомаклональной изменчивости льна в культуре in vitro немногочисленны. Rutkowska-Krause et al. установили, что длительность периода культивирования значительно увеличивает плоидность образующихся растений-регенерантов льна [1]. Естественный соматический мутагенез может быть усилен при культивировании организма в стрессовых условиях (повышенная или пониженная температура, засоление и др.). Есть сведения о получении форм, устойчивых к экстремальным факторам среды [2], засолению [3], стрессу [4], гербициду хлорсульфурону [5], а также появление альбиносных мутантов [6] в результате культивирования тканей льна in vitro.

Рост и развитие соматических клеток в культуре *in vitro* сами по себе могут рассматриваться как стресс (увеличение раневой поверхности, изменение гормонального баланса и др.), в результате которого усиливается частота и спектр генетической изменчивости (поли- и анеуплоидия, точковые мутации, передвижение мобильных элементов, соматический кроссинговер и др.).

А.В. Поляковым [7] проводилась оценка потомств растений-регенерантов, полученных на основе сортов льна-долгунца Торжокский 4, Дашковский 2, Славный 82 и Белинка по основным хозяйственно ценным признакам. В результате исследования были выделены два растения-регенеранта сорта Торжокский 4, которые по числу коробочек на 20-180% и по числу семян с растения на 28,8-92,4% превосходили исходный сорт, и один регенерант сорта Белинка, превосходящий исходный сорт по содержанию волокна на 11-19,5%.

Любой вид генетической трансформации, как и культивирование в условиях in vitro, может являться причиной резкого всплеска изменчивости в культуре клеток и тканей. Случайное и ненаправленное встраивание чужеродной ДНК сопровождается каскадом изменений в геноме трансформируемых растительных эксплантов. Последствия воздействия генетической трансформации любого вида могут рассматриваться как сложный, многоуровневый биотический стресс. Особенность проявления стресса заключается в том, что растение, будучи лишенным пространственной подвижности, необходимой для поиска лучшего места обитания, компенсирует это повышенной геномной и физиологической «подвижностью», «пластичностью», позволяющей гибко приспосабливаться к стрессовым факторам различной природы [8]. Трансформируемое растение подвергается нескольким видам стрессового воздействия: 1) поранение; 2) контакт с патогенным микроорганизмом (при агробактериальной трансформации); 3) культивирование *in vitro*; 4) собственно трансгенез, т.е. инсерция Т-ДНК в хозяйский геном. В ответ на любой вид стресса у растения происходит активация окислительных ферментов,

что может стать причиной целого спектра изменений в ДНК: от точечных мутаций до таких крупных изменений как аберрации и полиплоидия [9].

Одним из побочных эффектов трансгенеза является появление так называемых ложных трансформантов (в англоязычной литературе – «escapes»), растений, приспособившихся

к существованию на селективной среде с антибиотиком или гербицидом, но не содержащих в своем геноме чужеродной ДНК [10]. Такие генотипы уникальны и могут служить основой для создания новых сортов.

Цель данной работы состояла в изучении популяций растений-регенерантов, сформированных на основе ложных трансформантов.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали сорта льна-долгунца белорусской селекции Старт (Могилевская ОС), Василек и Белита (РУП «Институт льна»). Условия экспериментов по агробактериальной и биолистической трансформации описаны нами ранее [11, 12].

Молекулярно-генетический анализ растений регенерантов. ДНК выделяли из растений с помощью Genomic DNA Purification Kit («Fermentas») согласно инструкции производителя. Для изучения сомаклональной изменчивости использовали 10 пар праймеров (Lu2, Lu3, Lu4, Lu8, Lu13, Lu15, Lu17, Lu21, Lu23, Lu28) [13]. ПЦР выполняли по стандартному методу. Полученные ПЦР-продукты разделяли капиллярным гель-электрофорезом на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Appl. Bios., США).

Хромосомные препараты. При приготовлении хромосомных препаратов использовали технологию, адаптированную к мелкохромосомным растениям [14]. Кончики корешков длиной 1-1,5 см и обрабатывали 1×10^{-6} раствором интеркалятора ДНК

9-аминоакридином (1 мкг/мл, «Sigma», США) при температуре от 0 до 4 °C в течение 10 ч. Корни фиксировали в фиксаторе Карнуа 3:1 (этанол: ледяная уксусная кислота) в течение суток. Окраска корешков производилась 1%-ным раствором ацетокармина, после чего готовились давленые препараты. Препараты анализировали на микроскопе Leica DM RXA2 с оптикой Leica PlanAPO.

Световая микроскопия поперечного среза стебля. Анатомическое строение стебля изучали на поперечных срезах, взятых на середине технической длины всех растений-регенерантов на стадии желтой спелости. Отрезки стеблей 2-3 см фиксировали в размягчительной смеси спирт: вода: глицерин (1:1:1). Подсчеты и измерения проводили с помощью светового микроскопа Amplival и винтового окуляр-микрометра. Использовали увеличение 15×16, единицы измерения — деление окуляр-микрометра.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи пакета анализа данных Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

По результатам молекулярно-генетического анализа нами были отобраны шесть ложных растений-трансформантов, не несущих трансгенной вставки. Все они успешно адаптировались к условиям *ex vivo* и выращивались в контролируемых условиях климатической камеры. Наблюдения за онтогенезом данных растений показали, что фенологические стадии роста (елочка, быстрый рост, бутонизация, цветение, спелость) были намного продолжительней, чем у исходных сортов. Так, бутонизация наступила только после 180 дней

роста растений, тогда как весь вегетационный период у родительских сортов максимально составляет 105 суток. Пять ложных трансформантов сформировали генеративные органы и дали семена (V-1, V-2, V-3 от исходного сорта Василек, В-1 от исходного сорта Белита, S-2 от исходного сорта Старт).

Известно, что условия выращивания в значительной степени влияют на формирование хозяйственно ценных признаков, поэтому показатели растений, выращенных в контролируемых условиях, не могут быть стабильными

при последующей репродукции. Однако для выделения форм с положительными свойствами проведение первичной оценки необходимо.

Основная продуктивная часть растений льна-долгунца — это стебель, содержащий от 20 до 30% волокна, ради которого и возделывается эта культура. Признаки качества

волокна непосредственно зависят от внешних характеристик льняного стебля, в частности, от общей высоты растения, технической длины и толщины стебля в его средней части. В табл. 1 приведены результаты анализа морфологических признаков ложных трансформантов поколения R0.

Таблица 1 Морфологические признаки ложных трансформантов, полученных на основе сортов Василек, Белита, Старт (R0)

Образец	Растение, шт	Общая высота, см	Техническая длина, см	Кол-во коробочек, шт	Кол-во семян в коробочке, шт
V-1	1	150	92	5	6,2±1,3
V-2	1	150	92	11	4,5±0,8
V-3	1	140	95	7	6,1±1,1
B-1	1	128	104	8	6,75±0,9
S-2	1	100	90	2	13±0,5

По данным анализа, самыми высокими (признак «общая высота растения») оказались растения V-1, V-2; минимальная величина этого показателя отмечена у растения S-2 (100 см) (табл. 1). В ряде исследований показано, что высота растений льна-долгунца в зависимости от сортовых особенностей и условий выращивания варьирует в достаточно широком диапазоне (от 70 до 125 см), а при благоприятных условиях может достигать 130-140 см [15, 16].

Техническая длина стебля льна-долгунца — важный показатель продуктивности, от величины которого зависит урожай волокна. У изучаемых форм техническая длина стебля значительно превысила аналогичный показатель исходных сортов (62-78 см) и составила для растения В-1 — 104 см, для растения V-3 — 95 см, для растений V-1, V-2 — 92 см, для растения S-2 — 100 см (табл. 1). При промышленном производстве растения льна-долгунца с общей высотой 80-100 см гарантируют получение высокого урожая волокна и семян [17].

В сформировавшихся на всех растениях коробочках завязались семена. Семена растения S-2 оказались не всхожи. Популяции растений, полученных на основе V-1, V-2, V-3, В-1, были испытаны как в полевых условиях, так и в условиях *in vitro*.

Характеристика процессов каллусогенеза и морфогенеза гипокотильных эксплантов популяции растений льна-долгунца поколения R1

Данные о морфогенетической способности гипокотильных эксплантов потомства ложных трансформантов (поколение R1) представлены на рис. 1. Формирование каллуса и на гипокотильных эксплантах исследуемых растений, и на гипокотильных эксплантах исходных сортов проходило одинаково активно, однако количество эксплантов, продуцирующих побеги, значительно различалось. Так, регенерационная способность эксплантов популяций V-1, V-2, V-3 была примерно в 4 раза ниже, чем у эксплантов исходного сорта. Сравнительное изучение регенерационной способности эксплантов популяции В-1 и исходного сорта Белита выявило ту же закономерность - регенерация исходного сорта была в 3 раза выше, чем в популяции В-1 (рис. 1).

Возможно, что описанные эффекты связаны с пролонгированным действием стресса (трансформации), что вызвало генетическую нестабильность растений поколения R1. Подтверждением данного предположения является обнаружение полиэмбрионии в популяциях V-1, V-2. При анализе семян контрольной группы (1000 семян исходного сорта Васи-

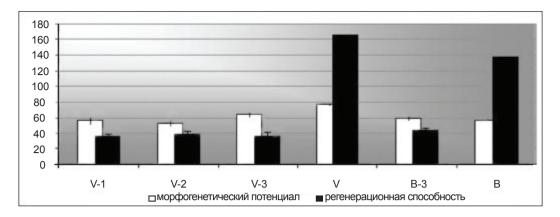


Рис. 1. Сравнение эффективности морфогенеза и регенерационной способности популяций растений «escapes» (R1) и исходных сортов

лек) ни одного близнецового сеянца нами не обнаружено. А.В. Поляковым было проанализировано более 600 000 проростков, относящихся к 125 образцам льна (лен-долгунец, межеумок, кудряш). Средняя частота полиэмбрионии составила 0,034%. Отмечено, что наименьшая частота появления близнецов была у льна-долгунца (0,032%) [18]

Близнецовые сеянцы легко отбираются по двум зародышевым корешкам, развивающимся из прорастающего семени. Обнаруженные нами близнецовые проростки разъединялись, высаживались в горшочки и выращивались в контролируемых условиях климатической камеры. Наблюдения за онтогенезом выявили разницу в развитии близнецов. Замедленная скорость роста и развития служат контролем гаплоидного состояния проростка, однако, окончательное подтверждение уровня плоидности можно получить с помощью цитологического подсчета хромосом в соматических клетках кончика корешка. Анализ метафазных пластинок корневых чехликов установил, что одна пара близнецов составляла сочетание гаплоидного и диплоидного растения, другая – гаплоидного и гаплоидного растения. Причины спонтанной полиэмбрионии точно не установлены. Данные многих исследователей указывают на полигенную природу признака. Показано, что из полиэмбриональных семян льна могут формироваться близнецовые растения в следующих комбинациях сочетаний: диплоиддиплоид, диплоид-гаплоид, гаплоид-гаплоид [18, 19].

Морфологические признаки популяции растений R1

При наблюдении за потомством растений ложных трансформантов в полевых условиях отклонений в развитии при прохождении фенологических стадий обнаружено не было. Анализ морфологических признаков поколения R1 выявил снижение средних значений показателей «общая высота растения» (от 10,5 до 28,8%) и «техническая длина» (от 8,0 до 28,8%) по сравнению с аналогичными показателями растений R0, в то же время показатель «количество коробочек» вырос в среднем в 4 раза, что, по-видимому, связано как с условиями роста растений, так и со снижением влияния посттрансформационного стресса (табл. 1, табл. 2).

Сравнительный анализ морфологических признаков популяции растений льнадолгунца R1 показал достоверное превышение уровня исходных сортов по признакам «общая высота растения» и «техническая длина» в двух популяциях – V-3, B-1; по признаку «количество коробочек» – в популяции V-3 (табл. 2).

При сравнении вариации морфологических признаков оказалось, что исходные сорта более однородны, чем полученные популяции поколения R1. Значения стандартного отклонения (σ) по всем анализируемым признакам в контрольных группах растений были ниже, чем в популяциях растений-регенерантов, за исключением σ признака «техническая длина» в популяции V-1 (табл. 2). Для сравнения вариабельности различных признаков рассчитан коэффициент вариации (υ), который дает

возможность сравнивать изменчивость признаков, выражающихся в различных единицах измерения, и устанавливать различия в степени изменчивости. При оценке результатов полевых испытаний первого года оказалось,

что признак «число коробочек» — наиболее изменчивая величина для всех исследуемых популяций (табл. 2), что может быть обусловлено как особенностями генотипа, так и особенностями самого признака [20].

Таблица 2 Морфологические признаки популяции растений R1

Параметр	V (контроль)	V-1 (R1)	V-2 (R1)	V-3 (R1)	В (контроль)	B-1 (R1)
Общая высота растения, см	113,7±3,2	106,8±3,9	117,3±2,9	125,3±2,9*	72,9±1,66	112,9±3,9*
σ	7,81±2,7	$7,8\pm2,75$	10,1±2,07	9,1±2,05	$6,5\pm1,18$	13,4±2,84
υ	$0,07 \pm 0,02$	0,1±0,02	0,1±0,02	0,07±0,02	0,09±0,01	0,1±0,02*
Техническая длина, см	80,2±3,1	77,0±1,73	81,9±2,31	87,4±3,25*	59,4±1,29	74,0±4,3*
σ	7,52±1,2	3,5±1,22	7,9±1,62	10,41±2,33	$5,0\pm0,92$	14,6±3,11
υ	0,09±0,01	0,1±0,01	0,1±0,01	0,12±0,02	0,08±0,01	0,2±0,04*
Количество семян в коробочке, шт.	27,2±2,9	26,7±4,15	27,5±4,37	43,4±4,04*	-	23,5±3,12
σ	7,33±2,9	$8,3\pm 2,93$	15,1±3,08	12,94±2,89	_	10,6±2,26
υ	0,27±0,1	0,3±0,11	0,5±0,11	0,29±0,07	_	0,4±0,09
Количество семян в коробочке, шт.	7,0±0,4	7,5±0,86	6,8±0,43	5,8±0,32	_	6,0±0,56
σ	1,09±0,6	1,7±0,61	1,5 ±0,03	1,0±0,23	_	1,9±0,40
υ	1,16±0,08	0,2±0,08	0,2±0,04	0,2±0,04	_	0,3±0,07

^{* –} достоверно при p < 0.05

В исследованиях А.В. Полякова отмечено, что популяции растений-регенерантов первого поколения по высоте и технической длине стебля находятся на уровне исходного сорта или выше, а по числу коробочек и семян на уровне или ниже контроля [18]. В других работах показано, что в большинстве случаев происходит снижение средних значений по количественным признакам, но возможно появление форм с положительными свойствами [21, 22].

Полученные нами данные свидетельствуют о нестабильности первого поколения растенийрегенерантов и необходимости проведения дальнейших испытаний созданных форм.

Анатомические особенности стебля популяции растений R1

Основная ценность стебля прядильных льнов – волокнистые пучки, которые относятся к механическим тканям, повышаю-

щим устойчивость к полеганию, изгибам, переломам и т.п. Они состоят из плотно склеенных пектиновыми веществами элементарных волокон — длинных клеток веретенообразной формы с заостренными концами. Количество и качество волокна льна-долгунца определяется степенью развития волокнистой ткани, т.е. лубяных пучков, расположенных в корковой части стебля и состоящих из элементарных волокон. Анатомические методы оценки качества волокна в стеблях льна широко используются в селекции данной культуры.

Агротехнические приемы оказывают значительное влияние на качество получаемого льняного волокна. В частности, разреженный посев ведет к формированию растений с толстыми стеблями, которые содержат крупные лубяные пучки и волоконца, но качество получаемого волокна невысокое. При посеве всхожих семян 1600-1800 шт/м² загущение угне-

тает активность клеток камбия и усиливает деление клеток перицикла. Как следствие, образуется большое число смыкающихся между собой компактно расположенных в стебле лубяных клеток и повышается выход качественного технического волокна [17, 23].

Небольшое количество семян, полученных нами от ложных трансформантов R0, не позволило обеспечить требуемую густоту стеблестоя растений поколения R1. Для корректности интерпретации результатов посев контрольных растений намеренно проведен с нарушением норм высева семян.

При исследовании строения растений поколения R1 обнаружено, что диаметр стебля колебался от 6,0 до 11,2 деления окулярмикрометра для популяции B-1; от 7,8 до 13,1 деления окуляр-микрометра для популяции V-1, V-2, V-3; для контрольных растений — 6,7-10,1 деления окуляр-микрометра, что являлось прямым следствием малой густоты стояния растений. В норме диаметр стебля у возделываемых сортов льна-долгунца может колебаться от 3,7 до 7,4 деления окулярмикрометра [24].

Известно, что хорошее по качеству волокно дают стебли, имеющие лубяные пучки правильной овальной или вытянутой формы с ровными краями без заливов и выступов. В целом анализируемые растения популяции V-1, V-2, V-3, В-1 характеризовались плотными хорошо сформированными пучками округлой, овальной и тангентальной формы. Проведенные анатомические исследования срезов средней части стебля в фазе желтой спелости позволили выявить особенности строения растений регенерантов популяций V-1, V-2, V-3, В-1 поколения R1 (табл. 3).

Таблица 3 Показатели анатомического строения стебля растений популяций поколения R1

Популяция	Число пучков на срезе	Число элементарных волокон на срезе	Среднее число элементарных волокон в пучке	Диаметр элементарного волокна	Диаметр просвета элементарного волокна
V (контроль)	32,5±0,7	778,2±22,3	23,9±0,2	50,7±1,6	14,2±0,9
V-1 (R1)	38,0±0,7*	831,5±53,4	21,9±1,7	51,4±2,1	14,8±1,7
V-2 (R1)	37,8±1,1*	873,6±37,0*	23,1±0,6	47,5±0,9	14,4±0,7
V-3 (R1)	39,5±0,9*	873,6±26,1*	21,1±0,2	48,9±0,8	14,6±0,6
B-1 (R1)	35,6±1,1	752,0±32,6	22,8±0,4	45,1±0,9	14,2±0,6

^{* –} достоверно при p < 0.05

Количество волокнистых веществ в льняном стебле зависит от количества пучков на срезе и числа элементарных волокон в пучке. Проведенный нами анализ установил, что количество пучков на срезе было максимальным у растений популяции V-3 (39,5), что является хорошим показателем как по сравнению с контрольными растениями нашего эксперимента (32,5), так и по сравнению с сортами льна-долгунца в целом (25-39,4) [24, 25]. Элементарные волоконца у качественного волокна должны быть некрупные, выровненные по диаметру с толстыми стенками и с небольшим просветом. Растения популяций V-1, V-2, V-3, B-1 имели хорошо вызревшие клетки граненой формы в количестве от 21,9 до 23,1 штук в одном лубяном пучке (табл. 3). Среднее число элементарных волокон в пучке у контрольного растения сорта Василек — 23,9 шт. Наиболее волокнистыми оказались растения популяций V-2 и V-3 (873,6 шт.). Наименьшее число волокон на срезе зафиксировано у растений популяции В-1 (752,0 шт.) (табл. 3). Показано, что в зависимости от генотипа значение данного признака может варьировать от 545 [25] до 1124 [24].

Диаметр клеток по растениям у анализируемых образцов колебался от 21,0 (В-1) до 86,0 (V (контроль), V-3) делений окуляр-микрометра и в среднем составил 51,5 (V-1), 47,5 (V-2), 48,9 (V-3), что сравнимо с популяцией контрольных растений (50,7 V (контроль)) (табл. 3). С.Ф.Тихвинский и др. предложили судить о качестве волокна в единичных

стеблях льна по коэффициенту вариации диаметра элементарных волоконец в одном типичном лубяном пучке [26]. Чем больше коэффициент вариации, тем короче элементарные волоконца, так как в этом случае в плоскость среза попадают их узкие концы и варьирование возрастает. Качество волокна в образцах с короткими волоконцами хуже из-за обрывности при прядении.

С помощью метода двухвыборочного t-теста с различными дисперсиями получена информация об изменчивости диаметра элементарных волокон в пучке у популяций, сформированных на основе ложных трансформантов, и исходного сорта льна-долгунца (рис. 2).

Коэффициент изменчивости колебался от 9% до 26% в популяции V-1, от 11% до 31% в популяции V-2, от 13% до 37% в популяции V3. У растений контрольной группы данный показатель варьировал в пределах 12-25%. В среднем коэффициент изменчивости в популяциях и в контрольной группе растений был практически одинаков (26%, 23%, 23%

и 24% соответственно). Анализ полученных данных доказывает влияние агротехники (густота стеблестоя) на показатель «диаметр элементарных волокон» растений льнадолгунца.

Таким образом, первичная оценка морфоанатомических показателей выявила недостаточную стабильность растений в популяциях V-1, V-2, V-3, B-1, полученных на основе ложных трансформантов, как следствие пролонгированного действия посттрансформационного стресса и нарушения агротехники (густота стеблестоя). Однако можно предположить, что растения данных популяций обладают качественным волокном, поскольку сформировали волокна граненой формы с небольшим внутренним просветом и в достаточно большом количестве в одном лубяном пучке [24, 25, 26]. Кроме того, растения популяций V-2, V-3 достоверно превзошли уровень исходного сорта по числу элементарных волокон на срезе на 12,2%.

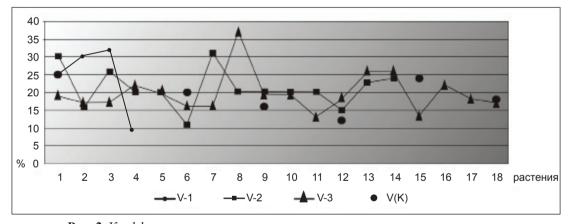


Рис. 2. Коэффициент изменчивости диаметра элементарных волокон в пучке

Молекулярно-генетический анализ популяции растений *R1*

Сомаклональные изменения могут иметь как наследственную генетическую природу, так и являться длительными модификациями. До недавнего времени большинство работ, посвященных изучению сомаклональной вариабельности, было связано с описанием морфологических и цитогенетических изменений у растений-регенерантов, а генетическая природа таких изменений оставалась неясной. В последнее время для исследования сомаклональной изменчивости широко используются молекулярные маркеры, основан-

ные на ПЦР, с помощью которых можно выявить изменения в нуклеотидной последовательности ДНК растений-регенерантов. Установлено, что уже на ранних этапах культивирования *in vitro* тканей кукурузы происходят перестройки генома, проявляющиеся в полиморфизме продуктов RAPD-ПЦР [28]. При сравнении спектров дигаплоидной линии яровой мягкой пшеницы Ю580R и полученных из нее гаметоклонов (ЛГВЗ-692-3-5, ЛГВ2-92-2, ЛГВ1-92-2) выявлено 13 полиморфных RAPD-фрагментов, что подтверждает гипотезу возникновения генетических измене-

ний в результате культивирования in vitro [29].

Применение молекулярных методов на разных этапах культивирования клеток дает возможность отслеживать генетическую изменчивость и делать предположения о времени и природе возникновения мутаций. С помощью RAPD- и ISSR- анализа были обнаружены изменения ДНК у сомаклонов гороха в зависимости от продолжительности культивирования каллусов и исходного генотипа. Уровень изменчивости для регенерантов гороха, полученных из каллусов после 8 месяцев культивирования, варьировал в зависимости от генотипа от 0 до 5,6%, а для регенерантов, полученных после десяти лет культивирования – от 0,7 до 9,6%. Для шести из двадцати полиморфных фрагментов по базе данных GenBank была выявлена гомология с известными последовательностями хлоропластного генома ДНК гороха, ретротранспозонами гороха Ту 3 соріа и Ogre; а также была найдена гомология с митохондриальной ДНК растительного генома [21].

Недостаточно высокая разрешающая способность RAPD-метода при анализе полиморфизма близкородственных генотипов льна-долгунца обусловила выбор нами микросателлитного анализа как высоковоспроизводимого, более точного и информативного. Важной особенностью микросателлитов является то, что они быстрее, чем остальная ДНК, подвергаются «динамичным мутациям», которые приводят к появлению аллелей с различным количеством повторяющихся единиц [30]. Как следствие, микросателлиты очень полиморфны. Высокий полиморфизм в сочетании с повсеместным распространением и мультиаллелизмом обуславливает их широкое применение в качестве эффективного способа изучения фенотипической и генотипической изменчивости [31].

Для проведения SSR-анализа растений популяции R1 нами отобрано 10 пар наиболее информативных праймеров, описанных ранее [13, 32]. Все пары праймеров дали четкую картину амплификации. Данные маркеры выявляли от 1 до 4 аллелей, всего идентифицировано 24 аллеля размером от 165 до 378 пн. Восемь пар микросателлитных праймеров (Lu2, Lu3, Lu4, Lu8, Lu15, Lu17, Lu21, Lu28) амплифицировали от одного до четырех аллелей. Фрагменты соответствующих размеров обнаружены как в образцах популяций V-1, V-2,

V-3, В-1, так и в исходных сортах, т.е. полиморфизм по данным локусам не был обнаружен. Две пары праймеров (Lu13, Lu23) выявили полиморфизм в исследуемых генотипах.

Микросателлитный праймер Lu13 амплифицировал два аллеля 346 пн и 378 пн. В популяциях V-1, V-2, V-3, как и в исходном сорте Василек, встречался аллель 378 пн. Однако в популяции V-3 выявлен дополнительный аллель размером 346 пн (рис. 3а). Растения популяции В-1 по данному локусу не отличались от исходного сорта Белита по обнаруженным аллелям размером 346 пн и 378 пн.

Микросателлитный праймер Lu23 амплифицировал два аллеля 257 пн и 318 пн. У растений контрольной группы (исходный сорт Белита) данный маркер выявил оба аллеля, однако в популяции В-1 обнаружен только аллель размером 318 пн (рис. 3в). Для анализируемых образцов популяций V-1, V-2, V-3, как и для исходного сорта Василек, был характерен аллель 257 пн. Появление нового аллеля 318 пн обнаружено в популяциях V-2 и V-3 (рис. 3б).

Таким образом, полиморфизм микросателлитной ДНК был установлен у образцов V-2, B-1 по одному локусу (Lu23), а у образца V-3 по двум локусам (Lu13, Lu23), который проявлялся в появлении второго аллеля (3 случая), а также в отсутствии аллеля ожидаемого размера (1 случай). Подавляющая доля мутаций в микросателлитных локусах возникает за счет специфической ошибки репликации ДНК в районе микросателлита – проскальзывания (англ. slippage), что приводит к появлению аллеля нового размера. В то же время часть микросателлитных мутаций может изменять количество повторов как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения (на два и более повторов). Мутационные изменения, затрагивающие размеры микросателлитных кластеров и число микросателлитных звеньев, изменяют такие важные молекулярно-биологические и биохимические характеристики как нуклеотидный состав, GC-содержание локусов, энергию Гиббса образования ДНК/ДНК-дуплекса, соотношение молекулярных масс 5'-3' и 3'-5' последовательностей.

Таким образом, метод SSR-анализа позволил нам обнаружить изменения в геноме потомства растений «escapes» льна-долгунца и выявить их отличия по генетической структуре от исходных форм.

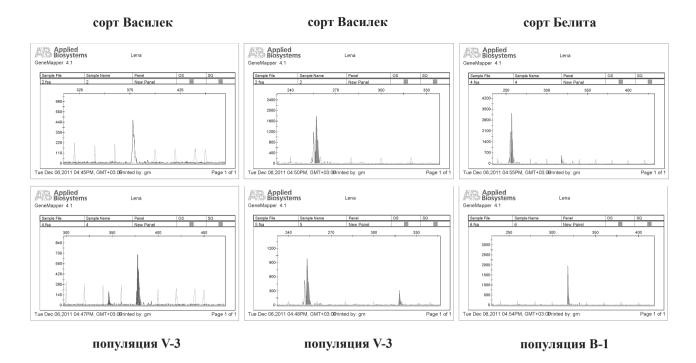


Рис. 3. Результаты амплификации ДНК растений с SSR праймерами

Морфологические признаки популяции растений R2

Несмотря на то, что использование сомаклональных вариаций в селекции предложено в 80-х годах прошлого века [33], на их основе создано очень мало сортов, что вероятно, связано с длительной нестабильностью семенных потомств растений-регенерантов. Для селекционного использования сомаклонов необходима достоверная информация о стабильности полученных хозяйственных признаков и уровне онтогенетической адаптации новых форм.

В 2011 году проходили полевые испытания семенного потомства растений-регенерантов R1. Отмечено, что в популяции R2 от исходного сорта Белита продолжительность вегетации растений сократилась на 7-10 дней по сравнению с контролем. В популяции R2 от исходного сорта Василек продолжительность вегетации оставалась на уровне контрольных растений.

Анализ морфологических признаков поколения R2 выявил увеличение средних значений показателей «общая высота растения», «техническая длина», «число коробочек» и «число семян» для популяций V-1, V-2, B-1 по сравнению с соответствующими группами контрольных растений (табл. 4). В популяции V-3 наблюдалось недостоверное снижение средних показа-

телей по признакам «общая высота растения» (на 2,3%) и «техническая длина» (на 1,7%) по сравнению с контролем (табл. 4). Сравнение вариации морфологических признаков показало, что в популяции растений поколения R2 произошла значительная стабилизация анализируемых признаков как по сравнению с первым годом полевых испытаний популяций, так и по сравнению с исходными сортами.

Значения стандартного отклонения по признакам «общая высота растения», «техническая длина», «количество коробочек», «количество семян» в поколении R2 были ниже, чем в поколении R1, за исключением о признака «количество семян» в популяции V-3, что свидетельствует о постепенной стабилизации и выравнивании материала (табл. 2, табл. 3). Можно заметить, что количество коробочек во всех популяциях при испытаниях первого года было в 2–3 раза больше, чем при испытаниях второго года, что является следствием разряженности посева в 2010 году и образования мощных ветвистых растений.

При сравнительном анализе популяций растений-регенерантов и исходных форм установлено, что значения σ по всем анализируемым признакам в популяции В-1 (R2) были ниже, чем в контроле (В). В популяции V-1 (R2) значения стан-

дартного отклонения были ниже, чем в контроле по двум признакам «общая высота растения» и «техническая длина». В популяциях V-2 (R2), V-3 (R2) значения о были ниже, чем в контроле только по одному признаку — «общая высота».

Для исследуемых признаков рассчитан коэффициент вариации, который показал, что признак «число коробочек» при испытании в течении двух лет проявил наибольшую изменчивость во всех исследуемых популяциях (табл. 4), что подтверждает предположение об особенности данного признака. Коэффициенты вариации (v) также служат показателями экологической стабильности, то есть способности растений к адаптации. При изучении изменчивости признаков многолетника эспарцета песчаного (Onobrychis arenaria) установлено, что сомакло-

нальные растения с небольшим варьированием морфологических признаков были устойчивы к погодным изменениям и из года в год сохраняли вегетативную мощь, в то время как у растений с высоким варьированием наблюдалось значительное снижение морфологических параметров на протяжении жизненного цикла [34]. Результаты второго года полевых испытаний созданных образцов показали, что изменчивость признака «общая высота растения» в популяциях V-1, V-3, В-1 достоверно ниже, чем у исходных сортов, и можно предположить, что данный признак относительно стабилизировался. Следует отметить, что для популяции B-1 (R2) характерна меньшая изменчивость и по всем остальным признакам, что свидетельствует о сбалансированности сформировавшегося генотипа (табл. 4).

Таблица 4 Морфологические признаки популяции растений R2

	I		1	1	T	
Параметр	V (контроль)	V-1 (R1)	V-2 (R1)	V-3 (R1)	В (контроль)	B-1 (R1)
Общая высота растения, см	118,8±1,9	129,9±0,72*	126,3±1,32*	116,1±1,10	105,6±2,55	119,6±1,02*
σ	6,25±1,4	$2,28\pm0,51$	4,16±0,93	3,48±0,78	8,07±1,80	3,24±0.72
υ	0,05±0,01	0,01±0,003*	0,03±0,007	0,03±0,007*	0,08±0,02	0,03±0,006*
Техническая длина, см	103,3±1,3	109,8±0,99*	109,4±1,36*	101,5±2,17	89,7±2,11	104,9±1,52*
σ	4,14±0,92	3,12±0,70	4,30±0,96	6,85±1,53	6,67±1,49	4,79±1,07
υ	0,04±0,01	0,03±0,006	0,04±0,009	0,07±0,01	0,07±0,02	0,05±0,01
Количество семян в коробочке, шт	5,7±0,39	12,1±0,64*	11,5±1,46*	9,2±0,74*	7,0±0,84	7,5±0,62
σ	1,25±0,28	2,02±0,45	4,62±1,03	2,35±0,52	2,67±0,60	1,96±0,44
υ	0,15±0,03	0,17±0,04	0,40±0,09*	0,25±0,057*	0,38±0,08	0,26±0,06
Количество семян в коробочке, шт	8,1±0,38	8,8±0,35	9,2±0,29*	8,9±0,46	6,9±0,41	8,6±0,52*
σ	1,19±0,26	1,13±0,25	0,92±0,20	1,45±0,32	1,29±0,29	1,65±0,37
υ	0,15±0,03	0,13±0,03	0,10±0,02	0,16±0,04	0,19±0,04	0,19±0,04

^{*} – достоверно при p < 0,05

Заключение

Таким образом, для поколения R1 ложных трансформантов льна-долгунца характерны нестабильность признаков вегетативного и генеративного развития. Во втором поколении (R2) происходит стабилизация признаков «общая высота растения», «техническая длина», «количество коробочек», «количество

семян». Генетическая трансформация, являясь стрессовым фактором, расширяет спектр генетической изменчивости льна-долгунца, выявляемой с помощью микросателлитного анализа, и в сочетании с индивидуальным отбором позволяет получить новый материал для селекции.

Список использованных источников

- 1. Rutkowska-Krause, I. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from another culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum* / I. Rutkowska-Krause, G. Mankowska, M. Lukaszewicz, J. Szopa // Plant Cell Rep. 2003. V. 22. P. 110–116.
- 2. Marshall, G. Somaclonal variation in *Linum usitatissimum* L. / G. Marshall, P. Courduries // Proceedings European Regional Workshop on Flax «Flax as a fibre and oil bearing crop». Brno, Czechoslovakia, 18-20 June 1991. P. 143-154.
- 3. McHughen, A.A Tissue culture derived salttolerant line of flax (*Linum usitatissimum* L.) / A. McHughen, M. Swartz // J. Plant Physiol. 1984. V. 117. P. 109–117.
- 4. O'Connor, B. Differential stress tolerance and cross adaptation in a somaclonal variant of flax / B. O'Connor, A. Robertson, L. Gusta // J. Plant Physiol. 1991. V. 139. P. 32–36.
- 5. Jordan, M. Selection of chlorsulfuronresistance in flax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures / M. Jordan, A. McHughen // J. Plant Physiol. – 1987. – V. 133. – P. 333–338.
- 6. Bretagne-Sagnard, B. Induced albina mutations as a tool for genetic analysis and cell biology in flax (*Linum usitatissimum* L.) / B. Bretagne-Sagnard, G. Fouilloux, Y. Chupeau // J. Exp. Bot. 1996. V.47. P.189–194.
- 7. Поляков, А.В. Биотехнология в селекции льна. Тверь, 2000. 180 с.
- 8. Walbot, V. The plasticity of the plant genome is it a requirement for success? / V. Walbot, C. Cullis // Plant Mol. Biol. Rep. 1983. V 1. P. 3–11.
- 9. Gaspar, T. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures / T. Gaspar, T. Franck, B. Bisbis, B. Bisbis, C. Kevers, L. Jouve, J. Hausman, Dommes // J. Plant Growth Regulation. 2002. V. 37. P. 263–285.
- 10. Jordan, M. Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots / M. Jordan, A. McHughen // Plant Cell Rep. 1988. V. 7. P.285–287.
- 11. Лемеш, В.А. Создание генетически модифицированных растений льна (*Linum usitatissimum* L.) методом агробактериальной трансформации / В.А. Лемеш, Е.В. Гузенко, А.И. Емец, О.А. Баер, Г.Я. Баер, Е.Н. Шиша, Я.Б. Блюм, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика. Сб. науч. тр. Институт

- генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол А.В. Кильчевский [и др.]. Минск: Право и экономика, 2009. Т. 9. С. 139–145.
- 12. Лемеш, В.А. Создание генетически модифицированных растений льна (*Linum usitatissimum* L.) методом биолистической трансформации / В.А. Лемеш, Е.В. Гузенко, А.И. Емец, О.А. Баер, Г.Я. Баер, Е.Н. Шиша, Я.Б. Блюм, Н.А. Картель // Весці НАН Беларусі. Сер. біял навук. 2010. №1. С.18–23.
- 13. C. Roose-Amsaleg, E. Cariou-Pham, D. Vautrin, R. Tavernier, M. Solignac. Polymorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum* L. // Molecular Ecology Notes. 2006. 6. P. 796–799.
- 14. Муравенко, О. Исследование хромосомной организации геномов мелкохромосомных растений / О. Муравенко, А. Зеленин // Генетика. 2009. Т. 45. №11. С. 1516–1529.
- 15. Ebskamp, J.M. Engineering flax and hemp for an alternative to cotton // Trends Biotechnol. -2002. Vol. $20. N_{2}6. P. 229-230$.
- 16. Morvan, C. Building flax fibers: more than one brick in the walls / C. Morvan, C. Andeme-Onzighi, R. Girault // Plant. Physiol. Biochem. 2003. Vol. 41. №11–12. P. 935–944.
- 17. Лен: энциклопеция / сост. Л.В. Ловчая; под ред И.А. Голуба. Минск: Беларус. энцыкл. імя П. Броўкі, 2009. 168 с.
- 18. Поляков, А.В. Биотехнология в селекции льна: Монография. Издание второе. М., 2010. 201с.
- 19. Obert, B. Doubled haploid production in Flax (*Linum usitatissimum* L.) / B. Obert, Z. Zackova, J. Samaj, A. Pretova//Biotechnology Advances. 2009. V. 27. P. 371–375.
- 20. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика. Изд. 3-е, испр. Минск: Вышэйш. школа, 1973. 320 с.
- 21. Кузнецова, О.И. Молекулярно-генетический анализ растений-регенерантов, полученных из длительно культивируемых каллусов гороха: автореф. дис. ... канд. биол.наук: / О.И. Кузнецова. М., 2005. 19 с.
- 22. Полонецкая, Л.М. Сравнительный анализ стабильности и генотипической изменивости признаков продуктивности популяций льна-долгунца *Linum usitatissimum* L, сформированных на основе регенерантов соматического происхождения / Л.М. Полонецкая, В.И. Сакович, Л.В. Хотылева //

- Современные проблемы генетики: мат-лы междунар. науч. конф., Минск, 17-18 ноября 2005 г.: в 2 ч. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский, [и др.]. Минск, 2005. Ч. 1. С. 184
- 23. Семенова, Е.Ф. Анатомо-морфологические особенности стебля в онтогенезе растений льна сорта Санлин и оценка его технического качества / Е.Ф. Семенова, А.Н. Чебураева, Т.М. Фадеева, Н.А. Морозкина // Сел. биол. − 2007. №5. С.94–99.
- 24. Генетика, физиология и биохимия льна / В.В. Титок и др., под общ ред. Л.В. Хотылевой. Минск: Беларус. навука, 2010.-220 с.
- 25. Федосова, Н.М. Особенности анатомического строения стеблей льна-межеумка // Вест. ВНИИЛК. 2003. №1. С. 17–21.
- 26. Тихвинский, С.Ф. Методы оценки качества льняного волокна на первых этапах селекции / С.Ф. Тихвинский, С.В. Доронин, Е.В. Дудина, И.Н. Бабинцева // Экономика производства и квалиметрия лубоволокнистых материалов. Вестник. 2003. С.73—75.
- 27. Сафина, Н.З. Источники высокого качества волокна для селекции льна-долгунца, выделенные с использованием анатомического метода: автореферат дис. канд. сельскохозяйственных наук: 06.01.05 / Всерос. науч.-исслед. ин-т растениеводства им. Н.И. Вавилова. Санкт-Петербург: РАСХН, 2003. 16 с.

- 28. Андреев, И.О. Генетические эффекты культивирования *in vitro* тканей кукурузы / И.О. Андреев, Е.В. Спиридонова, Д.Н. Майданюк, В.А. Кунах // Физиол. и биохим. культур. растений. -2009. -T. 41. -N26. -C. 487–495.
- 29. Беккужина, С.С. Гаплоидные технологии в ускоренном создании исходных форм и линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к засухе и *Septoria nodorum* BERK // автореф. дисс. д.б.н. М., 2011. 42 с.
- 30. Gao, L.F. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 108. P. 1392–1400.
- 31. Gupta, P.K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat / P.K. Gupta, R.K. Varshney // Euphytica. 2000. V.113. P.163–185.
- 32. Рачинская, О.А. Межсортовой полиморфизм геномов льна (*Linum usitatissimum* L.) по молекулярно-цитогенетическим маркерам / О.А. Рачинская, О.В. Муравенко, Н.Л. Большева и др. // Генетика. 2011. Т. 47. №1. С.1–11.
- 33. Larkin, P.J. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement / P.J. Larkin, W.R. Scowcroff // Theor. Appl. Genet. 1981. V. 60. P. 197–214.
- 34. Рожанская, О.А. Создание исходного материала для селекции кормовых культур в условиях Сибири с помощью методов биотехнологии: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: / О.А. Рожанская. Новосибирск, 2007. 129 с.

Дата поступления статьи 18 ноября 2011 г.

И.Б. Моссэ¹, А.Л. Гончар¹, К.В. Жур¹, Н.И. Моссэ², Л.А. Кундас ¹, Н.И. Бышнёв¹, П.Н. Малашевич³, А.В. Семеняков⁴

СРАВНЕНИЕ ГЕНОТИПОВ СПОРТСМЕНОВ РАЗНОЙ СПЕЦИАЛИЗАЦИИ ПО КОМПЛЕКСУ ГЕНОВ СПОРТИВНОЙ УСПЕШНОСТИ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
²ГУ «РНПЦ «Мать и дитя», Республика Беларусь, г. Минск, ул. Орловская, 66
³ГУ «Республиканский центр спортивной медицины» МСиТ Республика Беларусь, 220030, г. Минск, ул. Свердлова, 9
⁴Министерство спорта и туризма Республики Беларусь Республика Беларусь, 220030, г. Минск, ул. Кирова, 8, к. 2

Введение

Одной из актуальнейших задач спортивной генетики является разработка программ отбора начинающих спортсменов. Имеются отдельные публикации об отборе абитуриентов спортивных школ олимпийского резерва по полиморфным вариантам гена ангеотензин-конвертирующего фермента АСЕ. Известно, что аллель «I» этого гена ассоциирован с выносливостью, необходимой для стайеров, а аллель «D» – со скоростно-силовыми способностями, характерными для спринтеров. Однако отбор по одному гену не корректен, во-первых, потому что не известно, к какому типу отнести людей, гетерозиготных по данному гену, (а таких большинство!), а во-вторых, отсутствие благоприятного аллеля одного гена может компенсироваться положительными вариантами других генов. Кроме того, наличие нужного аллеля также не является гарантом достижения успехов в данном виде спортивной специализации из-за отсутствия других необходимых генных вариантов. Поэтому анализ одного гена (не только АСЕ, но и любого другого) не может быть достаточно информативным и не может быть использован для отбора абитуриентов.

Для разработки программ отбора начинающих спортсменов необходимо выяснить, какой комплекс полиморфных вариантов дает человеку возможность достижения высоких результатов в том или ином виде спорта. Для этого важно исследовать и сравнить генотипы вы-

дающихся спортсменов разной специализации.

Цель данной работы – сравнить частоты аллельных вариантов генов, присутствующих в генотипах элитных спортсменов разных видов спорта, для выявления наиболее информативных маркеров, определяющих способность адаптации к кратковременной или пролонгированной гипоксии. В этой связи нами протестированы образцы ДНК членов национальных команд Республики Беларусь по биатлону, хоккею и теннису как потенциальных носителей генотипов, наиболее благоприятных для видов спорта разной направленности.

Биатлон — циклический вид спорта, в котором требуется преимущественно аэробная выносливость. В хоккее преобладает скоростно-силовая направленность работы, и спортсмены преодолевают преимущественно анаэробный тип физической нагрузки. Теннис — игровой вид спорта, характеризующийся смешанным типом нагрузки, требующий как общей выносливости, так и скоростно-силовых способностей.

Учитывая разный тип преобладающей физической нагрузки в перечисленных видах спорта, определение и сравнение частот генов, присутствующих в их генотипах, позволит выявить наиболее важные и наиболее информативные аллели, обеспечивающие спортивную успешность в видах спорта разной направленности.

Материалы и методы

Для молекулярно-генетического тестирования нами отобраны образцы ДНК;

1. Национальной команды Беларуси по би-

атлону (18 чел.);

2. Национальной команды по хоккею с шайбой (24 чел.);

- 3. Национальной команды по хоккею на траве (24 чел.);
- 4. Национальной команды по теннису (23 чел);
- 5. Контрольной группы людей, профессионально не занимающихся спортом (150 чел.).

Биологическим материалом для исследования служила ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови.

Проанализированы полиморфные варианты семи генов – *HIF1*, *ACE*, *eNOS*, *VEGF*,

РАІ-1, МВ и PPARG, кодирующих белки, непосредственно участвующие в реакции организма на недостаток кислорода. Молекулярно-генетический анализ геномной ДНК спортсменов выполнен методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). После амплификации специфических ДНК-последовательностей генов идентификацию аллелей полиморфизмов проводили с применением различных методических подходов.

Результаты и обсуждение

Ген HIF1

Недостаток кислорода при высоких физических нагрузках ведет к активации гена *HIF1A*, который в свою очередь запускает экспрессию гипоксия-зависимых генов – *ACE*, *eNOS*, *PAI-1*, *BDKRB2*, *EPO*, *VEGF* и *ENDT-1*. В гене *HIF1A* имеется значимый полиморфизм – 582C/T. По данным [1], по-

лиморфизм 582С/Т ассоциирован с высокими аэробными возможностями.

При тестировании национальных команд в генотипах хоккеистов был обнаружен очень высокий (в 4 раза выше, чем в контроле) процент редкого аллеля Т полиморфизма 582С/Т, который дает повышенный уровень *HIF1* (табл. 1).

Таблица 1 Частоты генотипов и аллелей гена HIF1A в генотипах спортсменов разной специализации

Варианты гена, спортсмены		Генотипы, %	Аллел	ии, %	
HIF1A (C582T)	C/C	C/T	T/T	С	T
хоккеисты	77,94	22,06	0,00	88,97	11,03
теннисисты	91,67	8,33	0,00	95,83	4,17
биатлонисты	94,44	5,56	0,00	97,22	2,78
контроль	94,59	5,41	0,00	97,30	2,70

Существенное превышение уровня данного аллеля выявлено и у теннисистов (табл.1). Обнаружение этих редких полиморфизмов у элитных спортсменов свидетельствует о более высокой устойчивости их носителей к физическим нагрузкам и о важности данного маркера для отбора начинающих спортсменов.

Гены, детерминирующие факторы адаптации сердечно-сосудистой системы к гипоксии.

ACE — фермент ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем — гуморальных регуляторов артериального давления [2]. Полиморфизм гена ACE связан с инсерцией (I)

или делецией (D) 287 нуклеотидов [3]. Генотип I/I по гену *ACE* ассоциирован со сниженной концентрацией фермента и обеспечивает в 7-8 раз большую физическую работоспособность и лучшую адаптацию организма к тренировкам, чем генотип D/D. Частота встречаемости генотипа II гена *ACE* у жителей европейских стран колеблется от 16% до 24% [2]. По нашим данным частота этого генотипа в белорусской популяции составляет 15,3%.

По результатам тестирования генотипов хоккеистов высшей квалификации по гену *ACE* четкого разделения по генотипам и (или) аллелям не выявлено. Частоты генотипов D/D, характерных для спринтеров, почти равны частотам генотипов I/I, ассоциированных с выносливостью. Следовательно, выдающимися хоккеистами могут быть спортсмены не только с генотипами D/D, но также с генотипами I/D и I/I. Это еще раз свидетельствует о невозможности разделения начинающих спортсменов

на спринтеров и стайеров по одному гену ACE.

У биатлонистов выявлено некоторое преобладание аллеля выносливости I и генотипа I/I, по сравнению с хоккеистами и с популяционной частотой. Самая высокая частота генотипа I/I оказалась у теннисистов (табл. 2).

Таблица 2 Частоты генотипов и аллелей, детерминирующих факторы адаптации сердечнососудистой системы к гипоксии, у спортсменов разной специализации

Варианты гена, спортсмены	Генотипы, %			Аллели, %		
ACE (I/D)	I/I	I/D	D/D	I	D	
хоккеисты	19,0	57,1	23,8	47,6	52,4	
теннисисты	36,4	40,9	22,7	56,8	43,2	
биатлонисты	27,3	63,6	9,1	59,1	40,9	
контроль	15,3	54,0	30,7	42,3	57,7	
eNOS (a/b)	b/b	a/b	a/a	b	a	
хоккеисты	81,8	15,2	3,0	89,4	10,6	
теннисисты	63,6	31,8	4,5	79,5	20,5	
биатлонисты	81,8	18,2	0	90,9	9,1	
контроль	66,0	29,8	4,2	80,9	19,1	
eNOS (G/T)	G/G	G/T	T/T	G	T	
хоккеисты	28,6	59,5	11,9	58,3	41,7	
теннисисты	51,9	48,1	0,0	75,9	24,1	
биатлонисты	54,5	36,4	9,1	72,7	27,3	
контроль	59,5	35,3	5,2	77,2	22,8	

Подгруппа генов роста эндотелия сосудов.

VEGF играет центральную роль в процессе ангиогенеза, являясь основным фактором роста эндотелия сосудов. VEGF улучшает кровоснабжение мышечной ткани (как скелетной мускулатуры, так и миокарда) через увеличение количества новообразованных сосудов [4]. Синтез VEGF увеличивается под влиянием аэробных тренировок, а при воздействии гипоксии и забеге на сверхдлинные дистанции — снижается [4]. Нами проанализирована однонуклеотидная замена C634G.

В работе [5] показано, что средняя частота аллеля выносливости C634 в мире составляет 30%, по нашим данным в Беларуси она равна 25,3%. Некоторое превышение частоты того аллеля выявлено только у теннисистов (34,1%). У них же обнаружен высокий (в 3 раза выше, чем в контроле) уровень генотипа C/C (табл. 3).

PAI-1 впервые использован нами для выявления спортивной успешности. Этот ген является одним из основных компонентов антисвертывающей системы крови, обеспечивающим до 60% общей ингибиторной активности в отношении активатора плазминогена в плазме [6]. PAI-1 регулирует уровень тканевого и урокиназного активаторов плазминогена. Повышение уровня PAI-1 при гипоксии приводит к снижению фибринолиза и образованию фибриновой основы для роста сосудов в процессе ангиогенеза. Уровень PAI-1 в плазме крови ассоциирован с полиморфизмом в области промотора гена *PAI-1*, представляющего собой однонуклеотидную делецию/инсерцию гуанина (4G/5G).

Нами показано, что частота гомозиготных носителей аллеля 4G для Беларуси составляет 28,7%, а гомозиготных носителей аллеля 5G-21,3% [7]. При ДНК-тестировании спор-

тсменов установлено, что в команде биатлонистов благоприятные гомозиготы 4G/4G (63,5%) существенно превышают и контроль-

ный уровень, и аналогичный показатель у хоккеистов, у которых преобладают гетерозиготы -50.0% (табл. 3).

Таблица 3 Частоты генотипов и аллелей генов роста эндотелия сосудов у спортсменов разной специализации

Варианты гена, спортсмены	Генотипы, %			1 енотипы.			Аллел	ти, %
PAI-1 (4G/5G)	4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G	5G			
хоккеисты	33,3	50,0	16,7	58,3	41,7			
биатлонисты	63,5	27,3	9,1	77,2	22,8			
контроль	28,7	50,0	21,3	54,1	45,9			
VEGF (C634G)	G/G	C/G	C/C	G	С			
хоккеисты	61,9	35,7	2,4	79,8	20,2			
теннисисты	45,5	40,9	13,6	65,9	34,1			
биатлонисты	72,7	27,3	0,0	86,4	13,6			
контроль	53,8	41,8	4,4	74,7	25,3			

Гены, детерминирующие факторы адаптации к гипоксии системы транспорта кислорода и углеводно-жировой обмен.

МВ — железосодержащий белок мышечных клеток, аналог гемоглобина эритроцитов крови. *МВ* отвечает за транспорт кислорода в скелетных мышцах и в мышце сердца. В гене *МВ* нами протестирована однонуклеотидная замена A79G. Литературные данные по исследованию гена миоглобина очень ограничены.

По сведениям [8] и [9], среди представите-

лей европеоидной расы частота 79A полиморфизма составляет 46%. По нашим данным, частота аллели 79A в популяции Беларуси близка к литературным данным и составляет 40,7%, а частота генотипа AA - 3,5%.

У хоккеистов выявлено значительное превышение частоты редкого генотипа АА по сравнению с контролем и другими протестированными командами, что свидетельствует о важности этого полиморфного варианта для скоростно-силового вида спорта (табл. 4).

Таблица 4
Частоты генотипов и аллелей, детерминирующих факторы адаптации системы транспорта кислорода, у спортсменов разной специализации

Варианты гена, спортсмены	Генотипы, %			Алле	ли, %
MB (A79G)	GG	GA	AA	G	A
хоккеисты	16,7	69,0	14,3	51,2	48,8
теннисисты	42,3	50,0	7,7	67,3	32,7
биатлонисты	18,2	81,8	0,0	59,1	40,9
контроль	23,0	73,5	3,5	59,3	40,7
PPARG	Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala	Pro	Ala
хоккеисты	71,4	23,8	4,8	83,3	16,7
теннисисты	80,0	20,0	0,0	90,0	10,0
биатлонисты	54,5	45,5	0,0	77,3	22,7
контроль	73,3	25,4	1,6	85,7	14,3

PPARG – ген гамма-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом, кодирует семейство ядерных рецепторов, регулирующих экспрессию большинства генов, вовлеченных в жировой и углеводный обмен, а также сигнальный путь инсулина и дифференцировку остеобластов [3]. Наиболее значимым является полиморфизм P2o12A1a. Ala – аллель быстроты и силы, характеризуется пониженной транскрипционной активностью гена и повышенной чувствительность к инсулину. Для носителей аллеля Ala было отмечено более активное улучшение метаболизма глюкозы и инсулина в ответ на регулярные тре-

нировки на выносливость [3].

Встречаемость Ala аллеля у европейцев составляет в среднем от 9 до 18% по данным разных авторов. По нашим данным в белорусской популяции частота аллеля Ala составляет 14,3%.

В ходе тестирования групп элитных спортсменов установлено существенное превышение частоты встречаемости благоприятного редкого генотипа Ala/Ala у хоккеистов (табл. 4). Полученные результаты позволяют сделать вывод, что носительство этого генотипа способствует развитию и проявлению быстроты и силы.

Заключение

Проведено тестирование образцов ДНК членов Олимпийских и Национальных команд Беларуси по биатлону, хоккею и теннису как потенциальных носителей генотипов, наиболее благоприятных для этих видов спорта, с целью выявления наиболее информативных маркеров, определяющих способность адаптации к кратковременной или пролонгированной гипоксии. Получены предварительные результаты сравнения частот генотипов и аллельных вариантов генов, присутствующих в генотипах элитных спортсменов. Работа будет продолжена с привлечением большего количества Олимпийских и Национальных сборных команд, а также с использованием большего количества тестируемых генов.

Полученные на данном этапе результаты позволяют сделать вывод о том, что команды хоккеистов отличаются от изученных команд других видов спорта высокой частотой редкого генотипа АА по гену *MB* и также редкого, ассоциированного с быстротой и силой, генотипа Ala/Ala по гену *PPARG*. Кроме того в генотипах хоккеистов был обнаружен очень высокий (в 4 раза выше, чем в контроле) процент редкого аллеля Т гена *HIF1*, который ассоциирован с большими аэробными возможностями. У биатлонистов, по сравнению с хоккеистами и теннисистами, преобладают аллели выносливости G и генотипы G/G по гену *eNOS*, а также 4G аллели и 4G/4G генотипы по гену *PAI-1*, повышение уровня которого при гипоксии является основой для роста новых кровеносных сосудов.

Что касается теннисистов, то они отличаются высокой частотой редкого генотипа C/C по гену VEGF и также повышенными (но менее, чем у хоккеистов) уровнями редкого генотипа AA по гену MB и редкого аллеля T гена HIF1.

Выявление у выдающихся спортсменов этих редких вариантов генов, существенно повышающих физическую выносливость или скоростносиловые способности, может быть использовано для разработки программ отбора начинающих спортсменов.

Что касается гена *ACE* и полиморфизма a/b гена *eNOS*, то существенных различий по этим генам у протестированных команд выявлено не было.

Полученные результаты свидетельствуют том, что отбор начинающих спортсменов должен проводиться по комплексу генов, ответственных за работу различных систем организма, вовлеченных в спортивную деятельность человека.

Список использованных источников

- 1. Ahmetov, I.I. The role of gene variants in determination of individual differences in aerobic performance / I. I. Ahmetov [et al.] // 12th Ann. Cong. ECSS, July 11-14, 2007 / Jyvaskyla, Finland. Book of Abs. 2007. P. 357.
 - 2. Астратенкова, И.В. Анализ полиморфиз-

ма гена *АСЕ* у спортсменов / И.В. Астратенкова, А.И. Комкова // Сб. науч. тр. / Федеральное агентство по физической культуре и сорту, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт физической культуры; под ред. В.А. Рогозкина. – СПб, 2006. – С. 33–44.

- 3. Dias, R.G. Genetic polymorphisms determining of the physical performance in elite athletes / R.G. Dias [et al.] // Rev Bras Med Esporte. 2007. Vol. 13. №3 (Mai/Jun). P. 186–192.
- 4. Schneiderman, J, Sawdey, M.S., Keeton, M.R., Bordin, G.M., Bernstein, E.F., Dilley, R.B., Loskutoff, D.J. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries / Proc Natl Acad Sci USA, 1992. No. 89 P. 6998–7002.
- 5. Ahmetov, I.I. Polymorphism of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene (*VEGF*) and Aerobic Performance in Athletes / I.I. Ahmetov [et al.] // Human Physiology. 2008. Vol. 34. No. 4. P. 477–481.
- 6. Eriksson, P, Kallin, B, Hoof, F.M., Bavenholm, P, Hamsten, S. Allele specific

- increase in basal transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with myocardial infarction / Proc Natl Acad Sci USA, 1995. No. 92 P. 1851–1855.
- 7. Гончар, А.Л., Моссэ, И.Б., Иванов, А.А., Моссэ, Н.И., Моссэ, К.А. Ассоциация полиморфных вариантов гена *PAI-1* и мутации Factor V Leiden с генетической предрасположенностью к инфаркту миокарда / Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. 2009. Т. 9. С. 101–107.
- 8. Wu, J.Y. Hu, G. Liu. SNP A79G in the second exon of the myoglobin gene in elite long distance runners / Br J Sports Med. 2005. V. 39. P. 781–782.
- 9. Fernandez, E. [et al.] Analysis of the Myoglobin Gene in Heart Disease / Human mutations. 1997. №9. P. 426–430.

Дата поступления статьи 14 ноября 2011 г.

А.В. Кондратюк, А.В. Кильчевский, Е.И. Кузьминова

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ БЕЛОРУССКОЙ И ИНОСТРАННОЙ СЕЛЕКЦИИ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

В настоящее время идентификация сортов растений базируется на оценке морфологических и биохимических признаков. По мере создания все большего количества новых сортов этих признаков становится недостаточно. Значительное влияние на морфологические признаки условий окружающей среды, дополняемое элементом субъективности в оценке, может привести к неверным выводам относительно принадлежности генотипа к тому или иному сорту. Кроме того, некоторые диагностические признаки проявляются лишь на определенной стадии развития растения (цветения и созревания плода).

Сложности, связанные с использованием морфологических и биохимических (белковых) маркеров, приводят к необходимости поиска новых, более удобных и надежных методов идентификации сортов растений. Ими на полном основании могут стать молекулярногенетические методы, основанные на использовании ДНК-маркеров. Они позволяют в значительно большей степени выявить объективные различия между исследуемыми образцами и, следовательно, существенно повысить разрешающую силу анализа. ДНК-маркеры можно применять на любых стадиях развития расте-

ния, они более полиморфны и не подвержены влиянию окружающей среды. При использовании молекулярно-генетических методов, анализу можно подвергать различные части растения (листья, стебли, семена, клубни). ДНК-методы незаменимы в спорных случаях, когда применение традиционных подходов не позволяет достоверно различить исследуемые образцы.

В настоящее время SSR-маркеры все чаще используются для идентификации сортов сельскохозяйственных растений. Ряд важных особенностей SSR-локусов, такие как гипервариабельность, высокая плотность и равномерность распределения по геному, делают их весьма эффективным средством изучения меж- и внутривидового разнообразия.

На сегодняшний день выполнен ряд работ по SSR-анализу сортов и диких видов картофеля, результат которых демонстрируют высокую эффективность использования SSR-маркеров как средства идентификации растений [1-10].

Целью данной работы был микросателлитный анализ сортового полиморфизма картофеля белорусской и иностранной селекции, отбор наиболее информативных SSR-локусов для идентификации и последующей паспортизации.

Материалы и методы

Объектом исследований являлись 20 сортов картофеля белорусской и иностранной селекции, включенные в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород, допущенных к использованию на территории Республики Беларусь (Здабытак, Уладар, Журавинка, Бриз, Рагнеда, Ветразь, Дубрава, Универсал, Родео, Астерикс, Маг, Лилея, Талисман, Веснянка, Криница, Скарб, Атлант, Явар, Карлита, Сузорье).

Формы растений для исследований были предоставлены Государственной семенной инспекцией (каждый сорт был представлен 10 растениями).

Экстракцию ДНК проводили из клубней с помощью набора реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб» фирмы «Праймтех», согласно протоколу производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили с праймерами, представленными в табл. 1.

Таблица 1

Структура и хромосомная локализация микросателлитных локусов

Токус Повтор Локализация (хромосома) Прямой и обратный праймеры

№	Локус	Повтор	Локализация (хромосома)	Прямой и обратный праймеры
1	STM2022	(CAA)3(CAA)3	II	GCGTCAGCGATTTCAGTACTA TTCAGTCAACTCCTGTTGCG
2	STM1052	(AT)14 GT(AT)4	VII	CAATTTCGTTTTTTCATGTGACAC ATGGCGTAATTTGATTTAATACGTAA
3	STM1031	(GT)6	V	TGTGTTTGTTTTCTGTAT AATTCTATCCTCATCTCTA
4	STM0019	(AT)13	VI	AATAGGTGTACTGACTCTCAATG TTGAAGTAAAAGTCCTAGTATGTG
5	STM0031	(AT)7(GT)10(AT)4	VII	CATACGCACGCACGTACAC TTCAACCTATCATTTTGTGAGTCG
6	STM2013	(GT)5 (GC)4 (GT)4	VII	TTCGGAATTACCCTCTGCC AAAAAAAGAACGCGCACG
7	STM3012	(AC)5(AC)3	IX	CAACTCAAACCAGAAGGCAAA GAGAAATGGGCACAAAAAAAA
8	STM0030	(GCAC)(AC)2	XII	AGAGATCGATGTAAAACACGT GTGGCATTTTGATGGATT
9	STM1106	(GCAC)2	X	TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG ATGCGAATCTACTCGTCATGG
10	STM1104	(TCTA)6	XIII	TGATTCTCTTGCCTACTGTAATCG CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA
11	STM0037	(CT)4,(CT)8	XI	AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC ATTTGGTTGGGTATGATA
12	STM3023	(GT/GC)(GT)8	IV	AAGCTGTTACTTGATTGCTGCA GTTCTGGCATTTCCATCTAGAGA

Реакцию амплификации проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 50-100 нг ДНК, по 10 пмоль каждого из праймеров (прямые праймеры мечены флуоресцентными метками Rox, R6G, Tamra, Fam), буфер (10 мМ трис-HCl (pH 8,3), 2,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl), 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата и 0,5 ед. Тогпаdo Таq-полимеразы.

Полимеразную цепную реакцию проводили при следующих условиях: $95 \, ^{\circ}\text{C} - 15 \, \text{мин}$; $30 \, \text{циклов}$: $99 \, ^{\circ}\text{C} - 3 \, \text{сек}$, Тотж ($50\text{-}55 \, ^{\circ}\text{C}$) – $30 \, \text{сек}$, $72 \, ^{\circ}\text{C} - 30 \, \text{сек}$; $72 \, ^{\circ}\text{C} - 5 \, \text{мин}$.

Анализ полученных ПЦР-фрагментов проводился с помощью автоматического секвенатора Genetic Analyzer 3500 Applied Biosystems (США). Размер продуктов амплификации определяли с применением размерного стандарта молекулярного веса S450 «Синтол» (Россия).

Полученные данные анализировали с помощью пакета прикладных программ GeneMapper Software Version 4.1 (рис. 1).

Для оценки полиморфизма SSR-локусов использовали индекс полиморфного информационного содержания PIC (polymorphism information content): $PIC = 1 - \sum p_i^2$, где p_i – частота встречаемости і-го аллельного фенотипа в выборке. Ввиду сложности определения частот аллелей конкретного локуса у тетраплоидного картофеля, при расчете PIC, вместо частот аллелей, использовался показатель частоты аллельных фенотипов [1, 6].

Кластерный анализ выполнен методом UPGMA с использованием программы TREECON для Windows (версия 1.36). Для оценки достоверности построенных деревьев проведен бутстреп (bootstrap) анализ для 100 повторностей.

Результаты и обсуждение

Для анализа полиморфизма и генотипирования образцов картофеля было отобрано 12 микросателлитов — STM2022, STM1052, STM1031, STM0019, STM0031, STM2013, STM3012, STM0030, STM1104, STM1106,

STM3023, STM37. Отбор SSR-маркеров проводился на основе числа ранее детектированных аллелей, а также хромосомной локализации [5].

На начальном этапе вся совокупность

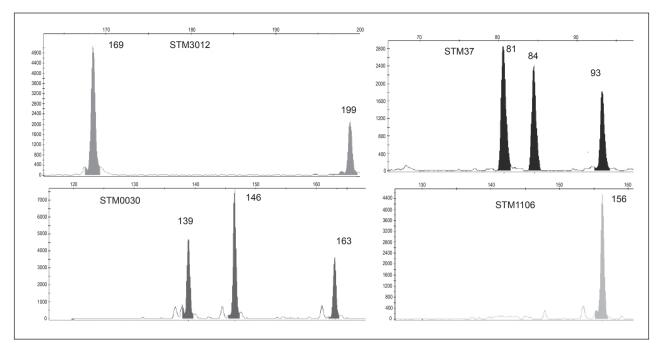


Рис. 1. Визуализация продуктов ПЦР (размер аллелей в п.н. локусов *STM3012, STM37, STM0030, STM1106* у сорта Сузоръе)

изучаемых сортов была исследована по трем наиболее полиморфным SSR-локусам (STM2013, STM0037, STM0030). Поскольку ДНК спектры всех индивидуальных образцов в пределах отдельно взятых сортов оказались идентичными по трем наиболее полиморфным микросателлитным локусам, был сделан вывод относительно однородности представленных сортов. В дальнейшем для анализа по 9 другим SSR-локусам ис-

пользовался 1 образец от каждого сорта [2].

Анализ вариабельности двенадцати микросателлитных локусов у 20 сортов картофеля выявил различный спектр изменчивости по анализируемым локусам. Максимальное число аллелей было идентифицировано для локусов *STM0019* (8), минимальное — для локусов *STM2022* (2), при среднем числе аллелей на локус 4,75 (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика SSR-маркеров

Микросателлит	Код аллели	Количество детектированных аллелей	Количество детектированных аллельных фенотипов	Размер аллелей	PIC
STM1106	A	4	4	145-161	0,57
STM0037	В	7	16	78-93	0,93
STM3012	С	4	6	169-203	0,75
STM1052	D	5	9	200-253	0,86
STM0031	Е	7	8	157-199	0,78
STM2013	F	6	13	149-167	0,91
STM 0019	G	8	11	164-234	0,86
STM0030	I	6	13	139-163	0,89
STM1031	J	5	9	268-282	0,80
STM1104	K	4	7	168-178	0,81
STM2022	L	2	2	193-233	0,26
STM3023	M	5	10	180-200	0,88

По данным проведенного SSR-анализа все локусы, за исключением STM2022, показали высокую эффективность в выявлении внутривидового полиморфизма и идентификации исследуемых сортов картофеля. Индекс полиморфного информационного содержания (РІС) взятых в анализ SSR-локусов для исследованных сортов был достаточно высок и варьировал в пределах 0,26-0,93. Средний показатель информативности двенадцати исследованных SSR-локусов составил 0,78. Количество детектированных аллельных фенотипов варьировало от 2(STM2022) до 16(STM0037). По многим SSR-локусам был получен ряд уникальных аллельных фенотипов, количество которых варьировало в зависимости от локуса *STM1106* (1), STM3012 (2), STM1052 и STM0031 (3), STM1104 (4), STM1031(6), STM2013 (8), STM0030 и STM0019 (9), STM0037 (13).

Для каждого сорта установлена индивидуальная аллельная формула (A, B, C.....L, М – обозначение микросателлитных локусов, цифры индексов – размеры аллелей в п.н.).

Метод позволяет выявлять и внутрипородные различия (рис. 2).

1. Здабытак

$$A_{_{145,147}}B_{_{78,84,93}}C_{_{169,197}}D_{_{212,229}}E_{_{191}}F_{_{149,159,164}}G_{_{191,207}}\\I_{_{139,146}}J_{_{270,282}}K_{_{176}}L_{_{193}}M_{_{180,183,190}}\\\textbf{2. Уладар}$$

$$\begin{array}{c} A_{161} B_{78}^{\bullet} C_{169,199} D_{229,253} E_{191} F_{151,157} G_{164,191,207} I_{133,148} J_{282} \\ K_{172,1\underline{76}} L_{193} M_{180,183,193} \end{array}$$

$$A_{156} \\ B_{80,84,91} \\ C_{169,199} \\ D_{212,221,253} \\ E_{173,191,199} \\ F_{151,167} \\ G_{191,203} \\ I_{139,146} \\ J_{268} \\ K_{168} \\ L_{193} \\ M_{180,183,190,200} \\ \textbf{5. Рагнеда}$$

$$\begin{array}{c} A_{161}B_{78,80,86,91}C_{169,197}D_{229,253}E_{183}F_{151,159,167}G_{180}I_{163}\\ J_{268}K_{168,172}L_{193}M_{180,200}\\ \textbf{6. Ветразь} \end{array}$$

$$A_{156,161}B_{78,80,82,86}C_{169,199}D_{212,221,229}E_{191}F_{151,164,167}\\G_{191,207}I_{139,163}J_{282}K_{168,176}L_{193}M_{180,183,200}$$
 7. Дубрава

$$\begin{matrix}A_{156}B_{80,84,91}C_{169,199,203}D_{212,229}E_{191}F_{149,151,159,167}G_{191,203}\\I_{139,146}J_{268}K_{168}L_{193}M_{180,183,190,200}\end{matrix}$$

8. Универсал

$$\begin{array}{c} \textbf{A}_{161}\textbf{B}_{78,82,91}\textbf{C}_{169,199}\textbf{D}_{229,253}\textbf{E}_{173,191}\textbf{F}_{151,159}\textbf{G}_{191,207}\textbf{I}_{139,146}\\ \textbf{J}_{268,270}\textbf{K}_{168,176}\textbf{L}_{193,233}\textbf{M}_{183,200}\\ \textbf{9. Pogeo} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} A_{161}B_{78,80,84}C_{169}D_{212,229,253}E_{173}F_{149,157,164}G_{191,197}I_{139}\\ J_{268}K_{168,178}L_{193}M_{180,200}\\ \textbf{10. Астерикс} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} A_{161}B_{78,86}C_{169,197}D_{212}E_{173,191}F_{149,159,164}G_{197}I_{141}J_{268}\\ K_{168,172}L_{193}M_{183}\\ \textbf{11. Mar} \end{array}$$

$$A_{156}B_{78,93}C_{169}D_{212,253}E_{191}F_{149,157,164}G_{191}I_{139,146}J_{274,282}K_{168}\\L_{193}M_{183,200}\\\textbf{12. Лилея}$$

$$A_{161}B_{78.91}C_{169.197}D_{229.253}E_{173}F_{149.157,164}G_{191}I_{146,163}\\ J_{268.270.282}K_{168,172}L_{193,233}M_{180,200}\\ \textbf{13. Талисман}$$

$$\begin{matrix} A_{161}B_{82,84,93}C_{169}D_{212,229}E_{191}F_{151,159,167}G_{191}I_{139,163}J_{268}\\ K_{168,178}L_{193}M_{180,193}\\ \textbf{14. Веснянка} \end{matrix}$$

$$A_{_{156}}B_{_{84,91,93}}C_{_{169,199}}D_{_{212,253}}E_{_{173,191}}F_{_{151,159,164,167}}G_{_{191}}\\I_{_{139,163}}J_{_{268,282}}K_{_{168}}L_{_{193}}M_{_{180,190,193,200}}$$
 15. Криница

$$\begin{matrix} A_{156,161}B_{78,80,82,86}C_{169,199}D_{221,229}E_{191}F_{151,159,164,167}\\ G_{191}I_{139,146}J_{282}K_{168,176}L_{193}M_{180,183,200}\\ \textbf{16. Ckap6} \end{matrix}$$

16. Скаро
$$A_{161}B_{78,86,91}C_{169,199}D_{221,229}E_{173}F_{149,159,164}G_{191,203}\\I_{139,149}J_{268}K_{168}L_{193}M_{180,200}\\\textbf{17. Атлант}$$

$$\mathbf{A}_{161}\mathbf{B}_{78,84}\mathbf{C}_{169,197,203}\mathbf{D}_{221,229}\mathbf{E}_{191}\mathbf{F}_{149,159,164}\mathbf{G}_{197,234}\mathbf{I}_{139}$$
 $\mathbf{J}_{270}\mathbf{K}_{168,172}\mathbf{L}_{193,233}\mathbf{M}_{200}$ **19. Карлита**

$$A_{161}B_{78,80}^{}C_{169,197}D_{212,229}E_{173,191}F_{149,159,164}G_{197,207}\\I_{139,163}J_{282}K_{172}L_{193}M_{180,183,200}\\\textbf{20. Сузорье}$$

$$\begin{matrix}A_{156}B_{81,84,93}C_{169,199}D_{200,221,253}E_{157,193}F_{151,159,164,167}\\G_{171,207}I_{139,146,163}J_{270,282}K_{172}L_{193}M_{180,200}\end{matrix}$$

На основе полиморфизма микросателлитных последовательностей построена дендрограмма, характеризующая генетические расстояния между исследуемыми сортами картофеля (рис. 2).

Заключение

В результате проведенного SSR-анализа с использованием двенадцати отобранных микросателлитных локусов было охарактеризовано генетическое разнообразие 20 сортов картофеля. Для каждого исследованного сорта установлена аллельная SSR-формула, которая может быть использована в качестве молекулярно-генетического паспорта.

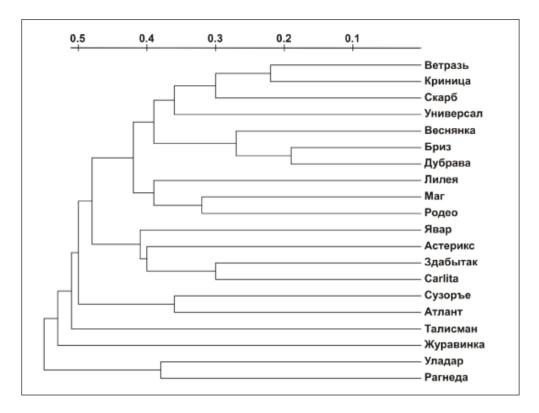


Рис. 2. Дендрограмма, отражающая генетическое сходство между исследованными сортами картофеля

Список используемых источников

- 1. Рыжова, Н.Н. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов сортов Картофеля *Solanum tuberosum* отечественной селекции / Н.Н. Рыжова, Е.В. Мартиросян, Е.З. Кочиева // Генетика. 2010. Т. 46. № 4. С. 481–487.
- 2. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК-маркеров: метод. рекомендации / С.В. Малышев [и др.]; под ред. С.В. Малышева. Минск: УП Камет, 2006. 27 с.
- 3. Molecular analysis of local potato cultivars from Tenerife Island using microsatellite markers / L. Barandalla [et al.] // Euphytica. 2006. Vol. 152. P. 283—291.

Microsatellite variation in potato landraces from the island of La Palma / R.J.I. De Galarreta [et al.] // Spanish J. Agricultural Research. – 2007. – V. 5. – P. 186–192.

4. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato / M. Ghislain [et al.] // Theor.

- Appl. Genet. 2004. Vol. 108. P. 881–890.
- 5. Raker, C.M. Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: microsatellite data / C.M. Raker, D.M. Spooner // Crop Sci. 2002. Vol. 42. P. 1451–1458.
- 6. Reid, A. A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars / A. Reid, M. Kerr // Plant Genetic Resources. 2007. Vol. 5. P. 7–13.
- 7. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato / D. Milbourne [et al.] // Mol. Gen. Genet. 1998. Vol. 259. P. 233–245.
- 8. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR) / M. Moisan-Thiery [et al.] // Potato Research. 2005. Vol. 48. P. 191–200.
- 9. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato / D. Milbourne [et al.] // Mol. Breeding. 1997. Vol. 3. P. 127–136.

Дата поступления статьи 14 декабря 2011 г.

Е.В. Белая¹, М.Е. Михайлова¹, Н.В. Батин²

ОЦЕНКА ИНДИВИДУАЛЬНОГО ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ГИПОФИЗАРНОГО ФАКТОРА РОСТА-1 (*bPIT-1*) И ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА-1 (*bIGF-1*) НА ПРИЗНАКИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ У ЧЕРНО-ПЕСТРОГО ГОЛШТИНИЗИРОВАННОГО КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27 ²ГУО «Институт подготовки научных кадров НАН Беларуси» Республика Беларусь, г. Минск, ул. Кнорина, 1

Введение

Одним из новейших селекционных направлений является маркер-сопутствующая селекция, marker assisted selection (MAS). сочетающая информацию о полиморфных вариантах генов, отвечающих за развитие количественных признаков, с данными об их фенотипическом проявлении. Преимуществом такого подхода является возможность быстрого выявления и отбора на ранних этапах постнатального развития сельскохозяйственных животных, обладающих повышенным генетическим потенциалом продуктивности, для получения дополнительной продукции при одновременном сокращении временных и материальных затрат.

Поиск высокоинформативных генетических маркеров в настоящее время ведется среди полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада, белковые продукты которых участвуют в регуляции экспрессии гена соматотропина

и опосредовании его лактотропных эффектов. К настоящему времени выявлено большое количество однонуклеотидных замен в структуре этих генов, которые могли бы быть использованы в маркерсопутствующей селекции в качестве генетических маркеров молочной продуктивности КРС. Поэтому актуальность приобретают исследования, направленные на выявление ассоциации таких полиморфизмов с количественными признаками продуктивности сельскохозяйственных животных и в частности крупного рогатого скота.

Нами исследованы HinFI-полиморфизм гена гипофизарного фактора-1 (*bPit-1*), инициирующего экспрессию гена гормона роста и SnaBI-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*), запускающего внутриклеточные метаболические ответы на воздействие соматотропина [1, 2, 3].

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили 329 образцов ДНК, выделенных из крови коров черно-пестрой голштинизированной породы, предоставленных животноводческими предприятиями Минской области. Источником информации о молочной продуктивности послужили племенные карты исследуемых

животных. Определение генотипов животных осуществлялось методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализа каждого полиморфизма приведены в табл.1.

Таблица 1 Индивидуальные характеристики условий ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов соматотропинового каскада

Полиморфизм	Условия амплификации	Последовательности праймеров	
<i>bPit-1</i> -HinFI [4]	94 °C – 1 мин; (95 °C – 45 сек; 56 °C – 60 сек;	HinFI-F: 5'aaaccatcatctcccttctt-3'	
0811-1-111111 [4]	72 °C – 60 сек) x 35; 72 °C – 10 мин	HinFI-R: 5'-aatgtacaatgtcttctgag-3'	
<i>bIGF-1-</i> SnaBI	95 °C – 5 мин; (95 °C – 30 сек; 64 °C – 30 сек;	SnaBI-F: 5'-atteaaagetgeetgeeee-3'	
[5]	72 °C – 30 сек) x 35; 72 °C – 10 мин	SnaBI-R: 5'-acacgtatgaaaggaact-3'	

Таблица 2

Характеристика SSR-маркеров

Полиморфизм гена	Рестриктаза	Замена нуклеотида /замена аминокислоты	Распознаваемый нуклеотид / аллель	Генотипы и соответствующие длины рестрикционных фрагментов
<i>bPit-1-</i> HinFI Экзон 6	Hinfl	A→G	A /bPit-1-HinfI ^B	<i>Pit-1</i> - Hinfl ^{AA} : 451; <i>Pit-1</i> - Hinfl ^{BB} : 244+207; <i>Pit-1</i> -Hinfl ^{AB} : 451+244+207
<i>bIGF-1-</i> SnaBI Экзон 1	SnaBI	T→C	T /bIGF1SnaBI4	IGF-1SnaBI ^{BB} : 249; IGF-1SnaBI ^{AA} : 223+26; IGF-1SnaBI ^{AB} : 249+223+26

Результаты и обсуждение

Схемы рестрикционного анализа продуктов амплификации исследуемых генов представлены в табл. 2.

Исследование индивидуальных фенотипических эффектов полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада осуществлялось в несколько этапов. На первом этапе нами выявлялись предпочтительные аллели и генотипы по каждому полиморфному варианту исследуемых генов. Под *предпочтительным аллелем* мы понимаем тот аллель, носители которого характеризуются более высокими показателями продуктивности по данному признаку по сравнению с носителями другого аллеля из этой пары. Аллель, входящий в структуру гомозиготных генотипов, характеризующихся пониженным уровнем продуктивности по данному признаку, обозначается как альтернативный аллель. Под предпочтительным генотипом мы понимаем тот генотип из трех возможных, обладатели которого характеризуются самым высоким уровнем продуктивности

по данному признаку. Выявление предпочтительного и альтернативного аллелей и генотипов проводилось путем сравнения непараметрических показателей продуктивности в группах с соответствующими генотипами между собой. Статистическая значимость наблюдаемых тенденций оценивалась с помощью теста Фишера. Данный метод позволяет оценивать различия между двумя и более группами, принадлежащими к одной генеральной совокупности, и применим на малых выборках (п ≤ 20) [6].

Затем нами проводилась оценка характера и степени проявления индивидуального фенотипического эффекта исследуемых полиморфных вариантов генов по отношению к показателям продуктивности общей выборки. Оценка характера индивидуального фенотипического эффекта генотипа на признак (повышающий/понижающий эффект) осуществлялась путем сравнения непараметрических характеристик генотипов с показателями общей выборки. Статистическая обработка дан-

ных осуществлялась методом интервального оценивания, путем определения 95% доверительного интервала для медианы [6]. Данный метод позволяет оценить значимость отличий между непараметрическими характеристиками группы с определенным генотипом, являющейся частью общей выборки, и непараметрическими характеристиками общей выборки.

Оценка степени проявления индивидуальных фенотипических эффектов полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада проводилась путем подсчета средних значений продуктивности по каждому признаку для каждого генотипа. Затем для каждого генотипа была проведена оценка превышения его индивидуального фенотипического эффекта по отношению к общей выборке (в %) и отбор ин-

дивидуальных генотипов-лидеров по данному признаку. Оценка статистической значимости отличий непараметрических характеристик группы с определенным генотипом от общей выборки осуществлялась методом интервального оценивания [6]. Те генотипы, обладатели которых характеризуются повышенными / пониженными показателями молочной продуктивности по сравнению с общей выборкой, обозначены как индивидуально повышающие/ понижающие генотипы по определенному признаку.

Данные о продуктивности особей с различными генотипами по полиморфизму bPit-1-HinFI у коров черно-пестрой голштинизированной породы представлены в табл. 3.

Таблица 3 Показатели молочной продуктивности у коров черно-пестрой голштинизированной породы по полиморфизму HinFI гена *bPit-1* Me (25%; 75%)

Генотип	n	Непараметрические характеристики	Удой, л	Жирномолоч- ность, кг	Белковомолоч- ность, кг
1-D:4-1 H:4-E144	14	Me (25%; 75%)	8475 (8309; 8955) *	332 (320; 346)*	273 (265; 283)*
<i>bPit-1</i> -HinFI ^{AA}		ДИ -95%; +95%	8279; 8859	317; 348	250; 283
<i>bPit-1-</i> HinFI ^{AB}	107	Me (25%; 75%)	8751 (8299; 9536)	348 (325; 380)	285 (262; 308)
DPII-I-HINFI		ДИ -95%; +95%	8485; 9233	339; 356	277; 292
1. D:4 1 II:EIRR	175	(Me 25%; 75%)	8890 (8258; 9589)	350 (329; 378)	290 (270; 311)
<i>bPit-1</i> -HinFI ^{BB}		ДИ -95%; +95%	8728; 9081	344; 363	283; 296
Общая выборка	296	Me (25%; 75%)	8878 (8288; 9533)	348 (327; 377)	287 (267; 308)

^{* –} генотипы, обладающие статистически значимым понижающим эффектом на признаки молочной продуктивности (при p < 0.05).

По данным, представленным в табл. 3, можно отметить, что наиболее распространенный аллель bPit-1-HinFI^B является предпочтительным по трем исследуемым признакам. Особи с генотипом bPit-1-HinFI^{BB} характеризуются более высокими показателями удоя, жирномолочности и белковомолочности по сравнению с особями с генотипом bPit-1-HinFI^{AA}. Превышение значений медиан у группы с генотипом bPit-1-HinFI^{BB}, по сравнению с группой с генотипом bPit-1-HinFI^{BB}, по сравнению с группой с генотипом bPit-1-HinFI^{AA}, составляет 415 л молока, 18 кг молочного жира и 17 кг молочного белка по признакам удоя, жирномолочности и белковомолочности соответственно. Гетерозиго-

ты bPit-1-HinFI AB , в данном случае, занимают промежуточное положение.

Результаты оценки достоверности различий групп животных с разными генотипами по полиморфизму bPit-1-HinFI между собой по показателям молочной продуктивности приведены в табл. 4.

По результатам применения теста Фишера при сравнении разных генотипов по полиморфизму bPit-1-HinFI между собой статистически значимые отличия выявляются в паре генотипов bPit-1-HinFI AA и bPit-1-HinFI BB по уровню удоя, жирномолочности и белковомолочности.

Таблица 4
Значения *р* статистики по результатам применения теста Фишера у групп животных с разными генотипами по полиморфизму гена *bPit-1*-HinFI

Сравниваемые пары генотипов		Удой, л	Жирномолочность, кг	Белковомолочность, кг
<i>bPit-1-</i> HinFI ^{AA}	<i>bPit-1-</i> HinFI ^{BB}	0,03*	0,07**	0,06**
<i>bPit-1-</i> HinFI ^{AA}	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{AB}	0,34	0,12	0,34
<i>bPit-1-</i> HinFI ^{AB}	<i>bPit-1-</i> HinFI ^{BB}	0,96	0,85	0,77

^{* –} различие между генотипами статистически значимо при p < 0.05;

Анализ характера фенотипического эффекта полиморфных вариантов гена bPit-1 на признаки удоя, жирномолочности и белковомолочности показал, что превышение значения медианы у группы животных с предпочтительным генотипом bPit-1-HinFI BB по отношению к общей выборке составляет всего лишь 12 л по удою, 2 кг по жирномолочности и 3 кг по белковомолочности. В то время как понижающий эффект генотипа bPit-1-HinFI AA по отношению к общей выборке составляет 403 л, 16 и 14 кг соответственно. Оценка статистической значимости отличий непараметрических характеристик групп с генотипами bPit-1-HinFI^{AA}, bPit-1-HinFI^{AB} и bPit-1-HinFI^{BB} от общей выборки путем интервального оценивания выявила достоверные отличия от выборки по трем признакам у группы коров с генотипом bPit-1-HinFI^{AA} (см. табл. 3). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что для применения данного полиморфизма гена bPit-1 в качестве генетического маркера повышенной молочной продуктивности черно-пестрого голштинизированного крупного рогатого скота в селекционных программах более целесообразно учитывать понижающий эффект генотипа bPit-1-HinFI^{AA}, чем повышающее влияние предпочтительного генотипа bPit-1-HinFI BB .

По данным Zwierzchowski et al., полученным при исследовании польского черно-пестрого голштинизированного скота, отмечается наличие положительной ассоциации bPit-1-HinFI⁴ аллеля с ежедневной продуктивностью молока, а также более высоким содержанием молочного жира [7]. Таким образом, имеются расхождения в наблюдаемых эффектах генотипа в разных популяциях одной породы. По нашему мнению, полученные нами данные свидетельствуют в пользу идеи Mukesh et al. о

том, что различный характер фенотипического эффекта одинаковых полиморфных аллелей у представителей разных популяций чернопестрой голштинизированной породы отличается по физиологическому эффекту из-за присутствия фоновых геномных влияний, которые сформированы под воздействием искусственного отбора [8]. В пользу такого мнения выступает также тот факт, что черно-пестрая порода, разводимая на территории Беларуси, была значительно голштинизирована в селекционных целях и условная доля породности для анализируемых в нашей работе животных составляет в среднем 30,16% черно-пестрой породы к 69,84% голштинской.

Данные о продуктивности особей с различными генотипами по SnaBI-полиморфным вариантам гена bIGF-1 у коров черно-пестрой голштинизированной породы представлены в табл. 5.

Анализ ассоциации SnaBI-полиморфизма гена инсулиноподобного фактора роста-1 с молочной продуктивностью черно-пестрых голштинизированных коров показал, что более редкий аллель bIGF-1-SnaBI^B является предпочтительным по трем исследуемым признакам молочной продуктивности. Так превышение значений медиан по этим признакам у коров с генотипом bIGF-1-SnaBI BB , по отношению к коровам с генотипом bIGF-1-SnaBI^{AA}, составляет 357 л молока, 16 кг молочного жира и 11 кг молочного белка по признакам удоя, жирномолочности и белковомолочности соответственно. Значения медианы и интерквартильного размаха признаков удоя, жирномолочности и белковомолочности у особей с генотипом bIGF-1-SnaBI^{AA} практически одинаковы с гетерозиготами bIGF-1-SnaBI AB . Это позволяет обозначить аллель bIGF-1-SnaBI^B как предпо-

^{** –} различие между генотипами статистически значимо при p < 0,1.

чтительный аллель, а генотип *bIGF-1*-SnaBI^{BB} как предпочтительный генотип по всем трем признакам молочной продуктивности.

Результаты оценки достоверности различий

групп животных с разными генотипами по полиморфизму *bIGF-1*-SnaBI по показателям молочной продуктивности между собой приведены в табл. 6.

Таблица 5 Показатели молочной продуктивности у коров черно-пестрой голштинизированной породы по полиморфизму SnaBI гена *bIGF* Me (25%; 75%)

Генотип	n	Непараметрические характеристики	Удой, л	Жирномолоч- ность, кг	Белковомолоч- ность, кг
1 ICE 1 C - DIRR	59	Me (25%; 75%)	9083 (8485; 9782)*	364 (339; 396)*	295 (273; 312)*
<i>bIGF-1</i> -SnaBI ^{BB}		ДИ -95%; +95%	8883; 9513	349; 373	289; 303
LICE 1 CmaDIAB	133	Me (25%; 75%)	8852 (8241; 9375)	345 (324; 375)	285 (267; 308)
bIGF-1-SnaBI ^{AB}		ДИ -95%; +95%	8561; 8999	338; 351	278; 295
LICE 1 Sup DI44	104	(Me 25%; 75%)	8726 (8167; 9503)	348 (320; 374)	284 (261; 306)
bIGF-1-SnaBI ^{AA}		ДИ -95%; +95%	8527; 9147	337; 363	275; 291
Общая выборка	296	Me (25%; 75%)	8878 (8288; 9533)	348 (327; 377)	287 (267; 308)

^{* —} генотипы, обладающие статистически значимым понижающим эффектом на признаки молочной продуктивности (при p < 0.05)

Таблица 6
Значения р статистики по результатам применения теста Фишера у групп животных с разными генотипами по полиморфизму гена bIGF-1-SnaBI

Сравниваемые пары генотипов		Удой, л	Жирномолочность, кг	Белковомолочность, кг
bIGF-1-SnaBI ^{BB}	bIGF-1-SnaBI ^{AA}	0,02*	0,01*	0,02*
bIGF-1-SnaBI ^{BB}	bIGF-1-SnaBI ^{AB}	0,03*	0,01*	0,06**
<i>bIGF-1-</i> SnaBI ^{AB}	<i>bIGF-1-</i> SnaBI ^{AA}	0,67	0,70	0,58

^{* –} различие между генотипами статистически значимо при p < 0.05;

По данным, приведенным в табл. 6, можно отметить, что в случае SnaBI-полиморфизма гена bIGF-1 предпочтительный генотип bIGF-1-SnaBI^{BB} по всем трем признакам молочной продуктивности статистически значимо ($\alpha=0,05$) отличается от альтернативного генотипа bIGF-1-SnaBI^{AA}, а также от гетерозиготного генотипа bIGF-1-SnaBI^{AB} ($\alpha=0,05$, кроме признака белковомолочности, где $\alpha=0,1$).

Результаты оценки характера фенотипического эффекта SnaBI-полиморфизма гена bIGF-1 на признаки удоя, жирномолочности и белковомолочности позволяют охарактеризовать его как повышающий по всем трем признакам. Разница в показателях продуктивности животных с предпочтительным гено-

типом bIGF-1-SnaBI^{BB} и общей выборкой составляет 205 л молока, 16 кг молочного жира и 8 кг молочного белка в пересчете на 305 суток лактации по признакам удоя, жирномолочности и белковомолочности соответственно. По данным интервального оценивания по признакам удоя, жирномолочности и белковомолочности, отличия группы животных с генотипом bIGF-1SnaBI^{BB} от общей выборки являются статистически значимыми.

Данные, касающиеся ассоциации SnaBIполиморфизма гена bIGF-1 с признаками молочной продуктивности у голштинизированного черно-пестрого скота, получены нами впервые и позволяют рекомендовать генотип bIGF-1-SnaBI^{BB} в качестве универсального

^{** –} различие между генотипами статистически значимо при p < 0,1.

ДНК-маркера повышенной молочной продуктивности по признакам удоя, жирномолочно-

сти и белковомолочности у представителей этой породы.

Заключение

Таким образом, по результатам нашего исследования следует отметить, что предпочтительный генотип не всегда характеризуется повышенным уровнем молочной продуктивности по сравнению с уровнем продуктивности по общей выборке. В таком случае, по нашему мнению, ДНК-типирование и отбор животных по таким генотипам являются недостаточно эффективными. Более того, в некоторых случаях понижающий эффект альтернативного генотипа по отношению к общей выборке выражен сильнее, чем повышающий эффект предпочтительного генотипа, как в случае полиморфизма HinFI гена bPit-1. Поэтому, на наш взгляд, при оценке перспективности применения полиморфных

вариантов потенциальных генов-кандидатов в качестве генетических маркеров повышенной продуктивности целесообразно проводить оценку характера фенотипического эффекта полиморфизма путем сравнения показателей продуктивности животных с соответствующими генотипами по данному признаку, как между собой, так и по отношению к показателям продуктивности общей выборки. Это позволяет не только установить предпочтительный генотип, но также качественно определить характер (повышающий/понижающий/нейтральный) и количественно оценить степень проявления фенотипического эффекта полиморфных вариантов гена на исследуемый признак.

Список используемых источников

- 1. Molecular and cellular aspects of insulinlike growth factor action / H. Werner [et al.] // Vitamins and Hormones. 1994. Vol. 48. P. 51–58.
- 2. SnaBI-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста (*bIGF-1*) / Е.В. Белая, М.Е. Михайлова // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. 2009. Т. 9. С. 153—159.
- 3. Влияние HinFI-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста *bPit-1* на признаки молочной продуктивности крупного рогатого скота голштинской и черно-пестрой пород / М.Е. Михайлова, Е.В. Белая // Молекулярная и прикладная генетика: сб.науч. тр. – 2010. – Т. 11. – С. 120–126.
- 4. Pit1 gene *Hinf I* RFLP and growth traits in double-muscled Belgian Blue cattle / R. Renaville [et al.] // J. Anim. Sci. 1997. Vol. $75. N_{2}1. P. 146-148.$

- 5. Effect of polymorphism in *IGF-1* gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle / E. Siadkowska [et al.] // Animal Science Papers and Reports. 2006. Vol. 24. №3. P. 225–237.
- 6. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA/O.Ю. Реброва. М.: МедиаСфера, 2002 312 с.
- 7. Effect of polymorphisms of growth hormone (GH), *Pit-1*, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black-and-White cows / L. Zwierzchowski [et al.] // Anim. Sci. Pap. Rep. 2002. Vol. 20. P. 213–227.
- 8. Analysis of bovine pituitary specific transcription factor-*Hinf I* gene polymorphism in Indian zebuine cattle / M. Mukesh [et al.] // Livestock Science. 2008. Vol. 113. P. 81–86.

Дата поступления статьи 18 ноября 2011 г.

Е.В. Белая¹, М.Е. Михайлова¹, Н.В. Батин²

КОМБИНИРОВАННЫЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СОМАТОТРОПИНОВОГО КАСКАДА (*bPIT-1*, *bPRL*, *bGH*, *bGHR И bIGF-1*) НА ПРИЗНАКИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27 ²ГУО «Институт подготовки научных кадров НАН Беларуси», Республика Беларусь, г. Минск, ул. Кнорина, 1

Введение

С целью повышения продуктивности сельскохозяйственных животных, в частности крупного рогатого скота (КРС), в мировой практике животноводства интенсивно внедряются методы маркер-сопутствующей селекции (МАЅ-селекция). В основе МАЅ-селекции лежит сочетание информации о молекулярногенетических полиморфизмах генов, отвечающих за количественные признаки, с данными об их фенотипическом проявлении.

Известно, что на процесс роста и лактацию у млекопитающих значительное влияние оказывает гормон роста (GH – cоматотропин) и группа гормонов, участвующих в опосредовании его эффекта на клеткимишени (соматотропиновый каскад). Среди генов, отвечающих за синтез гормонов соматотропинового каскада, в настоящее время активно ведется поиск потенциальных генов-кандидатов, влияющих на проявление количественных признаков крупного рогатого скота, в том числе на молочную продуктивность. У представителей различных пород КРС в настоящее время практически для каждого из генов соматотропинового каскада выявлен широкий спектр полиморфных вариантов, а некоторые из них исследованы на предмет влияния на признаки мясной и молочной продуктивности. Нами

проведено изучение комбинированного воздействия шести полиморфных вариантов пяти генов-кандидатов соматотропинового каскада на признаки молочной продуктивности у голштинской породы.

Нами исследованы следующие полиморфные варианты генов соматотропинового каскада:

- HinFI- и StuI-полиморфизмы гена гипофизарного фактора-1 bPit-1, запускающего экспрессию гена гормона роста [1, 2];
- RsaI-полиморфизм гена пролактина bPrl, белковый продукт которого является гуморальным регулятором лактации [3];
- AluI-полиморфизм гена гормона роста *bGH* – одного из ключевых регулято- ров роста и лактации у млекопитаю-щих [4];
- SspI-полиморфизм гена рецептора гормона роста *bGHR*, белок которого осуществляет передачу гуморального сигнала гормона роста к клеткаммишеням [5];
- SnaBI-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста-1 bIGF-1, запускающего внутриклеточные метаболические ответы на воздействие соматотропина [6].

Материалы и методы исследования

В качестве материала для исследования были использованы 109 образцов ДНК, выделенные из крови коров голштинской породы. Образцы цельной крови были получены из

СПК АК «Снов» Минской области. Источником информации о молочной продуктивности являлись племенные карты исследуемых животных.

Определение генотипов животных осуществлялось методом полимеразной цепной реакции — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР для

анализа каждого полиморфизма приведены в табл. 1.

Схемы рестрикционного анализа продуктов амплификации исследуемых генов представлены в табл. 2.

Таблица 1 Условия проведения ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов соматотропинового каскада

Полиморфизм	Условия амплификации	Последовательности праймеров		
<i>bPit-1-</i> HinFI [1]	94°C – 1 мин; (95°С – 45 сек; 56°С – 60 сек;	HinFI-F: 5'aaaccatcatctcccttctt-3'		
	72 °C – 60 сек) х 35 циклов; 72 °C – 10 мин	HinFI-R: 5'-aatgtacaatgtcttctgag-3'		
<i>bPit-1-</i> StuI [23]	95°C – 5 мин; (95 °C – 45 сек; 55 °C – 45 сек; 72 °C – 45 сек) х 35 циклов; 72 °C – 10 мин	StuI-F:5'-caaatggtccttttcttgttcag-3' StuI-R: 5'-ctttaaactcatggcaaatttc-3'		
1001 D 1121	95 °C – 5 мин; (95 °C – 30 сек; 63 °C – 30 сек;	RsaI-F: 5'-gctccagaagtcgttgttttc-3'		
bPRL-RsaI [3]	72 °C – 30 сек) x 30 циклов; 72 °C – 10 мин	RsaI-R: 5'-cgagcttatgagcttgattctt-3'		
LCII A11 [4]	95 °C – 5 мин; (95 °C – 30 сек; 64 °C – 30 сек;	AluI-F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3'		
<i>bGH</i> -AluI [4]	72 °C – 60 сек) х 30 циклов; 72 °C – 10 мин	AluI-R: 5'-gttcttgagcagcgcgt-3'		
1.CHD C	95 °C – 5 мин; (95 °C – 30 сек; 60 °C – 30 сек;	SspI-F: 5'-aatatgtagcagtgacaatat-3'		
bGHR-SspI [5]	72 °C – 30 сек) х 30 циклов; 72 °C – 10 мин	SspI-R: 5'-acgtttcactgggttgatga-3'		
hICE 1 SmaDI [7]	95 °C – 5 мин; (95 °C – 30 сек; 64 °C – 30 сек;	SnaBI-F: 5'-attcaaagctgcctgcccc-3'		
bIGF-1-SnaBI [7]	72 °C – 30 сек) х 35 циклов; 72 °C – 10 мин	SnaBI-R: 5'-acacgtatgaaaggaact-3'		

Таблица 2 Схемы ПДРФ-анализа продуктов амплификации исследуемых полиморфных локусов генов соматотропинового каскада

Полиморфизм гена	Рестриктаза	Замена нуклеотида /замена аминокислоты	Распознаваемый нуклеотид / аллель	Генотипы и соответствующие длины рестрикционных фрагментов
<i>bPit-1-</i> HinFI Экзон 6	Hinfl	A→G	A /bPit-1-HinfI ^B	<i>Pit-1</i> -HinfI ^{AA} : 451; <i>Pit-1</i> -Hinf I ^{BB} : 244+207; <i>Pit-1</i> -HinfI ^{AB} : 451+244+207
<i>bPit-1-</i> StuI Экзон 2	StuI	C→A Pro→His	C /bPit-1-StuI ^C	<i>Pit-1</i> -StuI ^{AA} : 234; <i>Pit-1</i> -StuI ^{CC} : 197+37; <i>Pit-1</i> -StuI ^{AC} : 197+37+234;
<i>bPrl</i> -RsaI Экзон 4	RsaI	A→G	A /bPrl-RsaI ^B	<i>Prl</i> -RsaI ^{AA} : 156; <i>Prl</i> -RsaI ^{BB} : 82+74; <i>Prl</i> -RsaI ^{AB} : 156+82+74
<i>bGH</i> -AluI Экзон 5	AluI	C→G Leu→Val	C /bGH-Alu ^I	<i>GH</i> -AluI ^{VV} : 208; <i>GH</i> -AluI ^{LL} : 172+35; <i>GH</i> -AluI ^{LV} : 208+172+35
<i>bGHR-SspI</i> Экзон 8	SspI	T→A Phe→Val	T /bGHR-SspI ^F	GHR-SspI ^{FF} : 182; GHR-SspI ^{FF} : 158+24; GHR-SspI ^{FY} : 182+158+24
<i>bIGF-1-</i> SnaBI Экзон 1	SnaBI	T→C	T /bIGF-1SnaBI ⁴	<i>IGF</i> -1SnaBI ^{BB} : 249; <i>IGF</i> -1SnaBI ^{AA} : 223+26; <i>IGF</i> -1SnaBI ^{AB} : 249+223+26

Анализ комбинированного влияния полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада на признаки молочной продуктивности включал следующие этапы.

На первом этапе нами был установлен характер (повышающий/понижающий по отношению к общей выборке) и степень проявления (% превышения среднего значения показателя по отношению к среднему значению показателя общей выборки) индивидуальных фенотипических эффектов для каждого из шести исследуемых полиморфных локусов. Оценка осуществлялась по показателям таких признаков молочной продуктивности, как удой, жирномолочность и белковомолочность [8, 9].

Так как число животных с редкими генотипами было менее 20 и характер распределения анализируемых признаков не соответствовал нормальному, то оценка характера фенотипического эффекта генотипов осуществлялась путем сравнения непараметрических характеристик с непараметрическими характеристиками общей выборки. Статистическая обработка данных осуществлялась методом интервального оценивания путем определения 95% доверительного интервала для медианы [10]. Данный метод позволяет оценить значимость отличий между непараметрическими характеристиками группы с определенным генотипом, являющейся частью общей выборки, и непараметрическими характеристиками общей выборки. Оценка степени проявления индивидуальных фенотипических эффектов проводилась путем подсчета средних значений продуктивности по каждому признаку для каждого генотипа и оценки превышения его индивидуального фенотипического эффекта по отношению к общей выборке в %. Это позволило осуществить отбор индивидуальных генотипов-лидеров по каждому признаку [8, 9].

На втором этапе осуществлялась оценка характера и степени проявления комбинированных фенотипических эффектов исследуемых полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада на анализируемые признаки. Для этого нами были составлены 120 возможных парных комбинаций генотипов (диплотипов) и в соответствии с которыми из общей выборки были сформированы группы животных для дальнейшего анализа.

Статистическая оценка проведена с помощью стандартного пакета программ «Statistica 6.0» (StatSoft, Inc. 1994-2001).

Результаты и обсуждение

Оценка молочной продуктивности проводилась по таким признакам, как общий удой за 305 суток лактации (выражается в литрах), жирномолочность и белковомолочность за тот же период (в кг).

Данные, описывающие характер и степень проявления индивидуальных фенотипических эффектов исследуемых полиморфизмов у коров голштинской породы, приведены в табл. 3. Для каждого генотипа в табл. 1 приведены средние значения признака плюс/минус стандартная ошибка, а фенотипические эффекты выражены в процентах превышения по отношению к среднему значению признака по общей выборке. Данные о статистической значимости приведены по результатам интервального оценивания, описанного выше [9, 10].

По данным, приведенным в табл. 3, можно отметить, что показатели молочной продуктивности у коров голштинской породы характеризуются низкой полиморфизм-

чувствительностью. Так из шести изученных полиморфизмов статистически значимые повышающие индивидуальные эффекты предпочтительных генотипов отмечаются только по признаку удоя и только для одного Sspполиморфизма гена рецептора гормона роста $(bGHR ext{-}\mathrm{Ssp})$. Превышение показателя удоя для предпочтительного генотипа в пределах данного полиморфизма по отношению к общей выборке составляет 2,53%. Слабо выраженный повышающий эффект на удой наблюдается также для генотипов bPit-1-HinFI BB и bIGF-1-SnaBI^{AA} (превышение показателя составляет 1,20 и 1,33% соответственно). Генотип bGHR-SspI^{FY} дальше в ходе анализа комбинированного влияния полиморфных вариантов обозначен нами как повышающий генотиплидер по признаку удоя. Наблюдаются также повышающие эффекты на признак жирномолочности у генотипов bPit-1-HinFI BB и bGHR- $SspI^{FY}$ (превышение показателя по отношению к общей выборке для этих групп животных составляет 1,59 и 1,85% соответственно), и по признаку белковомолочности генотипы bPit-I-HinFI BB (1,47%), bGHR-SspI FY (1,13%), bIGF-I-SnaBI AB и bIGF-I-SnaBI AA (0,85 и 1,11% соответственно). Однако, по результатам статистической обработки наблюдаемые тенден-

ции не являются значимыми. Тем не менее, в дальнейшем анализе комбинированных эффектов полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада на признаки молочной продуктивности эти генотипы обозначены как повышающие генотипы-лидеры по признакам жирномолочности и белковомолочности.

Таблица 3 Фенотипические эффекты полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада на признаки молочной продуктивности у коров голштинской породы (M ± m), % – превышение среднего значения показателя относительно общей выборки

Ген	Генотип	n	Удой ((л)	Жирномол (кг		Белковом ность	
			$M \pm m$	%	$M \pm m$	%	M ± m	%
	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{AA}	5	9559±388	-5,91	361±11	-1,65	301±7	-3,42
bPit-1	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{AB}	36	10013±229	-1,44	358±7	-2,44	305±6	-2,37
	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{BB}	68	10282±137	1,20	373±3	1,59	317±3	1,47
	<i>bPit-1-</i> StuI ^{AA}	1	9176	_ **	380	_	271	_
bPit-1	<i>bPit-1-</i> StuI ^{AC}	24	10125±282	-0,35	368±9	0,27	312±7	-0,11
	<i>bPit-1-</i> StuI ^{CC}	84	10182±128	0,21	367±4	-0,02	312±3	0,16
	<i>bPRL</i> -RsaI ^{BB}	1						
bPRL	<i>bPRL</i> -RsaI ^{AB}	21	10065±235	-0,94	364±8	-0,75	312±7	0,11
	<i>bPRL</i> -RsaI ^{AA}	87	10179±134	0,18	368±4	0,31	312±4	-0,04
	<i>bGH</i> -AluI ^{vv}	0	_	_	_	_	_	_
bGH	<i>bGH</i> -AluI ^{LV}	13	9909±394	-2,47	364±14	-0,75	300±8*	-3,74
	<i>bGH</i> -AluI ^{LL}	96	10194±121	0,33	368±4	0,23	313±3	0,48
	<i>bGHR</i> -SspI ^{YY}	4	10745±582	5,76	373±13	1,66	325±8	4,23
bGHR	bGHR-SspI ^{FY}	33	10414±154*	2,53	374±4	1,85	316±5	1,13
	bGHR-SspI ^{FF}	72	10011±138	-1,46	364±5	-0,77	310±4	-0,79
	bIGF-1-SnaBI ^{BB}	21	9808±240	-3,47	364±10	-0,88	299±7*	-4,18
bIGF-1	bIGF-1-SnaBI ^{AB}	47	10200±178	0,39	367±5	0,02	315±4	0,85
	bIGF-1-SnaBI ^{AA}	41	10295±196	1,33	370±6	0,72	315±5	1,11
Об	щая выборка	109	10160±	-98	367±	-3	312∃	=3

^{* —} генотипы, обладающие выраженным статистически значимым повышающим / понижающим эффектом на признаки молочной продуктивности (при p < 0.05);

Статистически значимые понижающие индивидуальные эффекты отмечаются только для признака белковомолочности по двум полиморфизмам bGH-AluI и bIGF-I-SnaBI. Понижающий эффект в этих случаях составил – 3,74% и –4,18% для генотипов bGH-AluI LV и bIGF-I-SnaBI BB соответственно. Далее эти генотипы были обозначены, как понижающие генотипылидеры по признаку белковомолочности. По признакам удоя и жирномолочности максимальные понижающие эффекты наблюдаются

по генотипам bIGF-1-SnaBI^{BB} и bPit-1-HinFI^{AB} и составляют – 3,47 и – 2,44% соответственно. Эти генотипы в дальнейшем анализе обозначены как понижающие генотипы-nudepu, по признакам удоя и жирномолочности.

Для исследования комбинированных фенотипических эффектов полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада на признаки молочной продуктивности у коров голштинской породы нами было проанализировано 120 возможных парных комбинаций генотипов (дипло-

^{** -} данные отсутствуют.

типы) по шести анализируемым полиморфизмам. Животные были разделены на группы в соответствии со своими парными генотипами. Для каждой группы была проведена оценка характера и степени проявления фенотипического эффекта комбинированного генотипа на признаки удоя, жирномолочности и белковомолочности по схеме, описанной выше.

Нами были установлены диплотипы, комбинированный фенотипический эффект которых

на признаки удоя, жирномолочности и белковомолочности превышал индивидуальные эффекты, отмеченные ранее у индивидуальных генотипов-*лидеров* и являлся статистически значимым. Средние значения показателей продуктивности для этих групп животных приводятся в табл. 4 и 5. В табл. 4 приведены диплотипы с повышающим характером комбинированного фенотипического эффекта на признаки молочной продуктивности.

Таблица 4 Диплотипы с повышающим характером комбинированных фенотипических эффектов; (M ± m), % – превышение среднего значения показателя относительно общей выборки

Признак	Nº	Структура диплотипа	M ± m	%
	116	bGHR-SspI ^{FY} / bIGF-1-SnaBI ^{AB} *	10511±249	3,45
Удой	10	<i>bGHR</i> -SspI ^{FY} / bPit-1-HinFI ^{BB} *	10543±241	3,77
удои	Индивид	уальный генотип- <i>лидер bGHR</i> -SspI ^{FY} *	10414±154	2,53
	Общая в	ыборка	10160±98	
	14	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{BB} / <i>bIGF-1</i> -SnaBI ^{BB} *	381±10	3,81
210	Индивид	уальный генотип-лидер $bGHR ext{-}\mathrm{SspI}^{FY}$	374±4	1,85
Жир	Индивид	уальный генотип- <i>лидер bPit-1</i> -HinFI ^{BB}	373±3	1,59
	Общая в	ыборка	367±3	
	13	<i>bPit-1-</i> HinFI ^{BB} / <i>bIGF-1-</i> SnaBI ^{AB} *	317±2	1,60
Fa	4	<i>bPit-1-</i> HinFI ^{BB} / <i>bPRL-</i> RsaI ^{AB} *	319±4	2,24
Белок	Индивид	уальный генотип-лидер bPit-1-HinFI ^{BB}	317±3	1,47
	Общая ві	ыборка	312±3	

^{* —} отличие группы от выборки значимо при p < 0.05).

По данным, приведенным в табл. 4, можно отметить, что по признаку удоя из двух приведенных диплотипов в обоих случаях структурообразующим является индивидуальный повышающий генотип-лидер bGHR-SspI^{FY}. В качестве генотипов, усиливающих фенотипический эффект индивидуального генотипалидера, в структуру диплотипа №116 входит генотип bIGF-1-SnaBI AB , а в структуру диплотипа №10 входит генотип bPit-1-HinFI BB . Оба эти генотипа обладают выраженным в различной степени индивидуальным повышающим эффектом на признак молочной продуктивности. Интересно отметить, что по признаку удоя у таких диплотипов наблюдается определенная пропорциональность при формировании совокупного фенотипического эффекта. Так генотип bIGF-1-SnaBI AB с меньшей степенью проявления индивидуального фенотипического эффекта (0,39%) образует диплотип №116 с меньшим индивидуальным превышением показателя (3,45%). В то же время генотип bPit-1-HinFI^{BB} с более высокой степенью проявления индивидуального повышающего эффекта (1,20%) образует диплотип с большим индивидуальным превышением (3,77%).

Диплотип №14 является примером случая формирования комбинированного фенотипического эффекта при участии полиморфизмов с противоположным характером индивидуальных фенотипических эффектов. Так, bPit-1-HinFI^{BB} генотип характеризуется повышающим эффектом на признак жирномолочности (превышение показателя относительно выборки составляет 1,59%), а генотип bIGF-1-SnaBI^{BB}, наоборот, понижает уровень удоя на 4,18% по отношению к общей выборке.

Для диплотипов №4 и 12, с повышающим комбинированным фенотипическим эффектом на признак белковомолочности, структурообра-

зующим генотипом в обоих случаях является индивидуальный повышающий генотип-лидер bPit-I-HinFI BB (см. табл. 3). В качестве усиливающих его фенотипический эффект выступают два генотипа: индивидуально повышающий генотип bIGF-I-SnaBI AB (диплотип N13) и индивидуально повышающий генотип bPRL-RsaI AB (диплотип N24), которые характеризуются индивидуальным повышающим эффектом 0,85 и 0,11% соответственно. В случае белковомолочности, в диплотипах N213 и N24 формирование комбинированного повышающего фенотипического эф-

фекта происходит непропорционально. Генотип bIGF-1-SnaBI^{AB} с более выраженным повышающим эффектом входит в структуру диплотипа №3, у которого повышающий эффект составляет 1,6%. В то же время генотип bPRL-RsaI^{AB} с менее выраженным индивидуальным повышающим эффектом 0,11% дает совокупный повышающий эффект диплотипа 2,24%.

Результаты анализа степени проявления понижающих фенотипических эффектов диплотипов у коров голштинской породы приведены в табл. 5.

Таблица 5 Диплотипы с понижающим характером комбинированных фенотипических эффектов; $(M\pm m), \%$ – превышение среднего значения показателя относительно общей выборки

Признак	Nº	Структура диплотипа	M ± m	%
	28	bIGF-1-SnaBI ^{BB} / bPit-1-HinFI ^{AB} *	9280±254	-8,66
Удой	54	bIGF-1-SnaBIBB / bPit-1-StuICC*	9581±196	-5,70
удои	Индивид	уальный генотип-лидер bIGF-1-SnaBI ^{BB}	9808±240	-3,47
	Общая вн	ыборка	10160±98	
	28	<i>bPit-1-</i> HinFI ^{AB} / <i>bIGF-1-</i> SnaBI ^{BB} *	338±6	-7,90
210	23	<i>bPit-1</i> -HinFI ^{AB} / <i>bGHR</i> -SspI ^{FF} *	355±7	-3,27
Жир	Индивид	уальный генотип-лидер $bPit$ - l - $HinFI^{AB}$	358±7	-2,44
	Общая вн	ыборка	367±3	
	28	bIGF-1-SnaBI ^{BB} / bPit-1-HinFI ^{AB} *	279±8	-10,58
	54	bIGF-1-SnaBI ^{BB} /bPit-1-StuI ^{CC} *	293±5	-6,09
Белок	Индивид	уальный генотип-лидер bIGF-1-SnaBI ^{BB}	299±7	-4,18
	Индивид	уальный генотип- <i>лидер bGH</i> -AluI ^{L/} *	300±8	-3,74
	Общая вн	ыборка	312±3	

^{* —} отличие группы от выборки значимо при p < 0.05).

Из данных, приведенных в табл. 5, очевидно, что во всех случаях при формировании комбинированного фенотипического эффекта диплотипов наблюдается пропорциональность согласно индивидуальному фенотипическому вкладу усиливающих генотипов.

Так, в структуру диплотипов №28 и №54, лидирующих по понижающему эффекту на признак удоя, в качестве структурообразующего входит индивидуальный понижающий генотип- $nudep\ bIGF-I$ -SnaBI BB , а в качестве усиливающих — генотипы bPit-I-HinFI AB и bPit-I-StuI CC . В этом случае, усиливающий генотип bPit-I-StuI CC со слабовыраженным повышающим индивидуальным фенотипическим эффектом 0,21%, дает меньший суммарный фенотипический эффект диплотипа №54

-5,70% по сравнению с диплотипом №28, где генотип bPit-1-HinFI^{AB} с более выраженным понижающим индивидуальным фенотипическим эффектом -1,44% дает более выраженный суммарный фенотипический эффект диплотипа -8,66%.

По признаку жирномолочности структурообразующую функцию в формировании понижающих диплотипов-лидеров выполняет индивидуальный генотип-лидер bPit-I-HinFI^{AB}. По данному признаку прослеживается пропорциональность индивидуального фенотипического вклада усиливающих генотипов. Индивидуальный понижающий фенотипический эффект усиливающего генотипа bGHR-SspI^{FF} составляет -0,77% по отношению к общей выборке, а комбинированный фенотипиче-

ский эффект его диплотипа (№23) составляет -3,27%. В то же время индивидуальный понижающий фенотипический эффект усиливающего генотипа bIGF-1-SnaBI^{BB} составляет -0,88% по отношению к общей выборке и комбинированный фенотипический эффект его диплотипа (№28) достигает -7,90%.

Пропорциональность фенотипического вклада усиливающего генотипа сохраняется также по признаку белковомолочности. Так диплотип №54 с меньшим суммарным фенотипическим эффектом -6,09% в качестве усиливающего генотипа содержит генотип bPit-1-StuI^{CC}, обладающий слабо выраженным повышающим индивидуальным эффектом (0,16%). Диплотип №28 с более высоким суммарным фенотипическим эффектом -10,58% в качестве усиливающего генотипа содержит генотип bPit-1-HinFI^{AB} у которого индивиду-

альный фенотипический эффект носит понижающий характер (-2,37%). По признаку белковомолочности, так же как и по признакам удоя и жирномолочности, при формировании понижающих диплотипов-лидеров структурообразующую функцию выполняет индивидуальный генотип-лидер bIGF-1-SnaBI BB , с самым сильным понижающим эффектом на признак белковомолочности (см. табл. 3).

Диплотип №54 является примером атипичного суммарного фенотипического эффекта по признакам удоя и белковомолочности, описанного ранее для повышающих диплотипов (см. табл. 4), когда в формировании суммарного фенотипического эффекта диплотипа принимают участие полиморфизмы гена гипофизарного фактора роста-1 и инсулиноподобного фактора роста-1 с противоположными характерами индивидуальных фенотипических эффектов.

Заключение

В результате проведенных исследований выявлены следующие закономерности:

- 1. При исследовании комбинаций генов, являющихся звеньями одной метаболической цепи, возрастает частота выявления статистически значимых совокупных фенотипических эффектов;
- 2. Среди парных комбинаций генотипов по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада встречаются такие, которые по влиянию на определенные признаки значительно превосходят максимальные фенотипические эффекты, наблюдаемые у индивидуальных генотипов-лидеров;
- 3. В подавляющем большинстве случаев структурообразующими для диплотиповлидеров по данному признаку (повышающих/понижающих) являются индивидуальные генотипы-лидеры. Роль усиливающих генотипов выполняют генотипы с таким же характером фенотипического эффекта (повышающим/

- понижающим), что и структурообразующий генотип. Исключение наблюдается только для парных комбинаций полиморфизмов гена гипофизарного фактора роста-1 (bPit-1) и гена инсулиноподобного фактора-1 (bIGF-1).
- 4. При формировании совокупного фенотипического эффекта отмечается пропорциональность фенотипического вклада усиливающего генотипа. Это означает, что усиливающий генотип с наибольшим индивидуальным эффектом входит в структуру диплотипов с наибольшим суммарным фенотипическим эффектом, кроме атипичных случаев формирования данного эффекта при участии полиморфных вариантов генов инсулиноподобного фактора-1 (bIGF-1).

Отмеченные закономерности распространяются как на эффекты повышающего, так и понижающего характера.

Список использованной литературы

- 1. Pit1 gene Hinf I RFLP and growth traits in double-muscled Belgian Blue cattle / R. Renaville [et al.] // J. Anim. Sci. 1997. Vol. 75. № 1. P. 146–148.
- 2. Huang, W. A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in
- dairy cattle / W. Huang, C. Maltecca, H. Khatib // Animal Genetics. 2008. Vol. 39. P. 554–557.
- 3. Restriction fragment length polymorphism associated with growth hormone and prolactin genes in Holstein bulls: evidence for a novel growth

hormone allele / C.M. Cowan [et al.] // Animal Genetics. – 1989. – Vol. 20. – P. 157–165.

- 4. Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle / R.S. Pawar [et al.] // Indian Journal of Animal Sciences. -2007. Vol. 11. N9. P. 884–888.
- 5. Distribution of allele frequencies important to milk production traits in lithuanian black & white and lithuanian red cattle / R. Skinkytė [et al.] // Veterinaria In Zootechnika. 2005. Vol. 31. №3. P. 93–97.
- 6. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action / H. Werner [et al.] // Vitamins and Hormones. 1994. Vol. 48. P. 51–58.
- 7. Effect of polymorphism in *IGF-1* gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle / E. Siadkowska [et al.] // Animal Science Papers and Reports. 2006. Vol. 24. №3. P. 225–237.

- 8. Полиморфные варианты генов соматотропинового каскада *bPit*-1 и *bPrl* для ДНК-типирования признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота голштинской породы / М.Е. Михайлова, Е.В Белая // Весці Нацыянальнай акадэміі навук. Серыя біялагічных навук. 2011. №2. С. 49—53.
- 9. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада bGH, bGHR и bIGF-1 на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы / М.Е. Михайлова, Е.В Белая // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2011. Т. 55, №2. С. 63—69.
- 10. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. М: МедиаСфера, 2002. 312 с.

Дата поступления статьи 18 ноября 2011 г.

И.С. Гордей, Н.Б. Белько, И.С. Щетько, И.А. Гордей

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ДУПЛИКАЦИИ ГЕНОМА У ОЗИМОЙ РЖИ (SECALE CEREALE L.)

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

В эволюции большинства высших растений полиплоидия сыграла решающую роль. Широкое распространение полиплоидных форм в природных популяциях и их значение для процессов видообразования установлено на большом и разнообразном фактическом материале. По образному выражению П.М. Жуковского, «человечество питается в основном продуктами растительной полиплоидии» [1]. Установление роли дупликации геномов в эволюции живых организмов [2] обуславливает необходимость экспериментального обоснования генетических эффектов и молекулярно-генетических механизмов этого явления.

Экспериментальная полиплоидия на современном этапе является одним из перспективных методов создания генетического разнообразия исходного материала для селекции. Однако, интенсивность работ за последние 10 лет по созданию новых тетраплоидных сортов озимой ржи снизилась, что обусловлено ограниченностью генофонда и недостаточной изученностью генетической изменчивости при дупликации генома [3].

Дупликация генома (полиплоидия) — больше, чем простое удвоение генома. Она включает комплекс молекулярно-генетических процессов, ведущих к геномным перестройкам [4-7]:

- 1. Геномные перегруппировки, обмен между геномами, рекомбинации между гомеологичными хромосомами;
- 2. Дифференциальная элиминация генов дублированного генома;
- 3. Диферсификация гена приобретение геном новой функции на основе избыточности ДНК, функциональное расхождение генов;
- 4. Перегруппировка последовательностей ДНК, метилирование ДНК;

- 5. Изменение структуры хроматина, активация ретротранспозонов, вызывающих транслокации хромосом;
- 6. Эпигенетическое замолкание генов после дублирования важнейший фактор полиплоидной эволюции;
- 7. Изменение пространственной организации хромосом в интерфазном ядре, обуславливающее изменение эпигенетического контроля экспрессии генов.

Известно, что у полиплоидов в профазе первого деления мейоза, как правило, образуются мультивалентные комплексы хромосом в отличие от бивалентных комплексов у диплоидов. При этом нарушается кроссинговер между гомологичными хромосомами и распределение хромосом по дочерним клеткам. Нарушения конъюгации хромосом в мейозе могут явиться причиной их структурных изменений – дупликаций, делеций, транслокаций или инверсий отдельных участков хромосом. Показано, что у модельных полиплоидов наблюдаются быстрые потери одних генов и специфическая инактивация других за счет метилирования [8]. В настоящее время не вызывает сомнений влияние пространственной организации хромосом в ядре растений на регуляторную функцию генов в развитии. Вопрос о пространственном положении генетического материала в интерфазном ядре эукариотической клетки в последнее время приобретает особое значение, так как рассматривается в свете эпигенетического контроля экспрессии генов [7].

Эти и другие изменения генетического аппарата при дупликации генома вызывают наследственно обусловленные разнообразные проявления ботанико-морфологических, анатомических, молекулярно-генетических, цитологических, физиологических, биохимических и других признаков и свойств растений.

Материалы и методы

Материалом исследований служили новые диплоидные сорта и гибриды (RR, 2x=14) и созданные на их основе тетраплоидные формы (RRRR, 4x=28) озимой ржи (Secale cereale L.). Тетраплоидные формы ржи получены в лаборатории хромосомной инженерии растений Института генетики и цитологии НАН Беларуси с использованием усовершенствованного метода полиплоидизации растений закисью азота (N_2 O) [8]. Цитологический анализ ключевых этапов микроспорогенеза и определение фертильности пыльцы проводили на давленых препаратах апикальных меристем корня и пыльников, окрашенных 2%-м раствором ацетокармина в 45%-й уксусной кислоте.

Анализ хромосомного состава ди- и тетраплоидных форм проводили с примене-

нием модифицированного С-метода дифференциального окрашивания хромосом ржи (С-бэндинг) [9].

Электрофорез запасных белков семян (секалинов) проводили в полиакриламидном геле в вертикальных пластинах электрофоретической камеры «VE-4M», производства ООО «Биоклон» по методическим указаниям ВИР [10].

Специфичность геномов диплоидной и тетраплоидной озимой ржи на уровне ДНК устанавливали методом ПЦР с произвольными праймерами (RAPD-анализ). ДНК выделяли с помощью Genomic DNA Purification Kit фирмы Fermentas. В качестве маркера молекулярного веса использовали 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) [11].

Результаты и обсуждение

Принимая во внимание повышенный уровень геномной нестабильности вновь созданных аутотетраплоидов и его влияние на их общую продуктивность, проведено изучение хромосомного состава тетраплоидных форм и исходных дипло-

идных сортов озимой ржи. Результаты цитологического анализа потомства тетраплоидных форм ржи представлены в табл. 1 и свидетельствуют о незначительном (до 9,7%) присутствии анеуплоидных растений в популяциях.

Таблица 1 Содержание анеуплоидных растений у созданных тетраплоидных форм озимой ржи

	Число хромосом у растений								
Тетраплоидные формы	28		27		28 + фрагм. хром.				
	растений, шт.	%	растений, шт.	%	растений, шт.	%			
Алькора	68	98, 6	1	1,4	_	_			
Зарница	56	93,3	3	5	1	1,7			
Юбилейная	54	100	_	_	_	_			
Плиса	62	90,3	5	8,1	1	1,6			

Выявленные анеуплоиды были представлены в основном 27-хромосомными гипотетраплоидами. Количество их у разных тетраформ ржи было различным и варьировало в интервале 0-8,1%. Наибольшее количество 27-хромосомных растений (8,1%) выщепилось в потомстве тетраплоидной формы ржи Плиса. У тетраплоидной ржи Юбилейная гипотетраплоидные растения отсутствовали.

Формирование гипертетраплоидных растений (28 хромосом + фрагмент хромосомы) отмечено в 3,3% случаев у тетраплоидных форм Зарница и Плиса.

Из исследованных тетраформ озимой ржи наибольшей стабильностью хромосомного состава характеризовалась форма Юбилейная, тогда как форма Плиса содержала максимальное количество анеуплоидных растений.

С целью изучения стабильности и сбалансированности кариотипов 28-хромосомных растений озимой ржи, а также выявления возможных хромосомных перестроек, вызванных дупликацией генома, проведен сравнительный анализ кариотипов созданных тетраплоидов с исходными диплоидными сортами с использованием С-метода

дифференциального окрашивания хромосом.

Установлено, что включенные в анализ 28-хромосомные растения являлись геномно сбалансированными тетраплоидами (RRRR, 4x=28) и не содержали видимых структурных изменений хромосом (рис. 1).

Для полученных форм тетраплоидной озимой ржи характерны следующие особенности стабилизации генома:

• низкая частота содержания и узкий спектр выщепления в потомстве анеуплоидных растений;

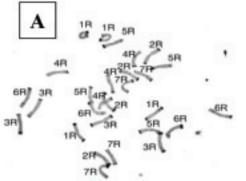


Рис. 1. Кариотипы тетра (А) и исходной диплоидной (Б) форм озимой ржи Алькора

Для более полного исследования генетических эффектов дупликации генома у новых тетраплоидных форм проведен анализ процесса мейоза.

Мейоз является одним из важнейших и универсальных биологических процессов в жизненном цикле эукариотических организмов, размножающихся половым путем [12]. Поэтому только при глубоком и детальном изучении всех нарушений, возникающих на этапе микроспорогенеза, можно понять причины нарушения кроссинговера между гомологичными хромосомами, механизмы образования хромосомных перестроек и повышенного содержания анеуплоидов у аутотетраплоидов.

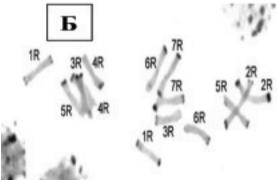
У созданных тетраплоидов озимой ржи наблюдаются значительные нарушения в мейозе, что приводит к «реверсии плоидности» и образованию клеток иных уровней плоидности, в том числе анеуплоидных [2,11].

В целом, нарушения мейоза, наблюдаемые в материнских клетках микроспор в первом и втором мейотических делениях у тетраплоидных форм и диплоидных сортов, были аналогичными. Однако у тетраплоидов мейоз протекал со значительно большими нарушениями (табл. 2), к числу которых относятся:

 генотипическая специфичность частоты и спектра выщепления анеуплоидов.

Наблюдаемые особенности, на наш взгляд, обусловлены следующими факторами:

- разным уровнем нарушений в мейозе у исходных диплоидных сортов и созданных на их основе аутополиплоидов;
- гибелью анеуплоидов с числом хромосом, значительно отклоняющимся от эуплоидного в результате элиминации зигот;
- отсутствием мутагенного эффекта закиси азота при полиплоидизации растений.



- мультивалентные и унивалентные ассоциации хромосом в метафазе I;
- отстающие униваленты, фрагменты хромосом и хромосомные мосты в анафазе I;
- присутствие микроядер в диадах и тетрадах микроспор;
- отстающие униваленты, фрагменты хромосом и хромосомные мосты в анафазе II;
- асинхронное деление в клетках диады;
- образование пентад, гексад и других типов полиад.

Проведенные исследования показали, что у тетраплоидных форм озимой ржи среди хромосомных ассоциаций преобладали биваленты. Помимо бивалентов, со значительной частотой встречались уни-, три- и квадриваленты, число которых на клетку варьирует.

Как видно из табл. 2, у полученных тетраплоидов, в отличие от диплоидной ржи, в метафазе I достаточно часто (от 7,9 до 19,2%) встречались микроспороциты с унивалентными хромосомами. При этом модальным классом у всех форм были материнские клетки пыльцы (МКП) с одним унивалентом. Частота МКП с унивалентными хромосомами у диплоидных форм на стадии метафазы I составила 1,2-3,3%.

Таблица 2 Частота нарушений по стадиям мейоза у новых тетраплоидных форм и исходных диплоидных сортов ржи, %

Сорта и формы	Метафаза I	Анафаза I	Метафаза II	Анафаза II	Тетрады
	Те	страплоидные фо	рмы (RRRR, 2n=28)	1	
Плиса-тетра	10,4	5,8	26,9	24,6	18,3
Юбилейная-тетра	7,9	8,5	13,1	15,0	8,3
Зарница-тетра	11,8	9,0	23,4	23,4	20,7
Алькора-тетра	19,2	16,7	32,8	21,2	13,3
Среднее	11,7*	9,9*	22,2*	19,1*	14,0*
		Диплоидные со	рта (RR, 2n=14)		
Плиса	3,1	1,7	1,6	2,1	0,9
Юбилейная	2,5	2,2	1,2	2,9	0,5
Зарница	3,3	1,8	1,1	2,5	1,0
Алькора	1,2	1,6	1,9	2,1	0,7
Среднее	2,5	1,8	1,5	2,4	3,1

^{* –} различия достоверны при p < 0.05.

В литературе отмечается ряд причин, обуславливающих более высокую частоту возникновения унивалентов у тетраплоидных форм [13,14]:

- пространственная организация хромосом в интерфазном ядре тетраплоидов отличается от таковой у диплоидов;
- гомологичные хромосомы должны пересечь более длинный путь для конъюгации;
- некоторые хромосомы расположены таким образом, что силы притяжения гомологов с двумя другими настолько уравновешены, что хромосомы не в состоянии эффективно двигаться к любой гомологичной хромосоме, гомологичные хромосомы не коньюгируют и остаются в виде унивалентов (истинные униваленты);
- многие ассоциации хромосом не прочны, что приводит к преждевременному образованию унивалентов еще до наступления позднего диакинеза или ранней метафазы (ложные, или псевдоуниваленты);
- тетраплоидное состояние может отличаться цитогенетической несбалансированностью, что также влияет на образование хромосомных ассоциаций.

В анафазе I в среднем количество МКП с нарушениями у тетраплоидных форм составило 9,9%, у диплоидных – 1,8%. Наибольшим

(16,7%) количеством МКП с нарушениями на этой стадии мейоза характеризуется форма тетраплоидной ржи Алькора, наименьшим (5,8%) – Плиса (табл. 2). Наиболее типичным нарушением для этой фазы мейоза является образование анафазных мостов.

Анафазные мосты предположительно могут образоваться по двум причинам [15]:

- напряжение в тетраплоидном микроспороците может оказаться больше, чем нити могут выдержать. Происходит разрыв хромосомной нити, а воссоединение осуществляется иным образом, вследствие чего возникает мост;
- специфичная гомологичная конъюгация четырех хромосом может иногда привести к негомологичному спариванию, которое сопровождается кроссинговером. При воссоединении может возникнуть различное расположение хромосомных сегментов, вследствие чего мосты могут образовываться в мейозе следующего поколения.

Во втором мейотическом делении нарушения встречались чаще, чем в первом, и частота их была выше у тетраплоидов, в сравнении с соответствующими фазами мейоза у диплоидной ржи (табл. 2). В среднем в метафазе II у тетраплоидных форм количество аномальных МКП почти в 2 раза больше, чем в метафазе I

и составило 22,2%. У диплоидных форм этот показатель на данной стадии составлял 1,5%. В анафазе II количество МКП с нарушениями у тетраплоидных форм озимой ржи превышало соответствующий показатель в анафазе I почти в 2 раза (19,1%). У диплоидных форм этот показатель составлял 2,4%.

В целом для всех исследованных тетраформ характерна тенденция к увеличению количества аномальных МКП на последующих стадиях мейоза. У большинства созданных тетраплоидных форм ржи нарастание мейотической нестабильности продолжалось вплоть до стадий метафазы II - анафазы II. На стадии же тетрад отмечается повышение количества нормальных МКП, общее для всех форм.

Попытки объяснить причины нарушения процесса мейоза у индуцированных аутотетраплоидов предпринимали ряд исследователей [15, 16]. Авторы предполагают, что удвоение хромосом приводит к нарушению тонко сбалансированной системы взаимодействия генов контроля мейоза у диплоидных растений. В настоящее время картирован ряд мейотических мутаций (sy1, sy9 sy10, sy18, sy19), контролирующих отдельные

этапы процесса мейоза у озимой ржи [17].

Главным недостатком экспериментально полученных полиплоидов, существенно ограничивающим использование их в селекции, является, как известно, пониженная семенная продуктивность, обусловленная нарушениями формирования микроспороцитов. Эта особенность аутополиплоидов представляет собой серьезное препятствие в селекционной работе, за исключением вегетативно размножаемых форм, когда бессемянность является желательным товарным признаком (арбузы).

Фертильность пыльцы является показателем нарушения формирования микроспороцитов. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что в целом показатель фертильности пыльцы у тетраплоидных форм озимой ржи варьировал от 48,2% (Юбилейная) до 77,3% (Зарница). Фертильность пыльцы у анализируемых тетраплоидных форм составила в среднем 62,0%. У диплоидных сортов озимой ржи этот показатель находился на уровне 95,0-98,6%. В среднем фертильность пыльцы по диплоидам составила 96,8%, что достоверно выше (p < 0,05), чем у тетраплоидных форм (табл. 3).

Таблица 3 Фертильность пыльцы у диплоидных (RR, 2x=14) и тетраплоидных (RRRR, 4x=28) форм озимой ржи

			P 0 P 0 3 2 2							
		Пыльцевых зерен								
Сорта и	Плоид-		Фертил	Фертильные		Стерильные		Промежуточные		
формы	ность	Всего	Кол-во, шт	%	Кол-во, шт	%	Кол-во, шт	%		
П	4x=28	710	374	52,7	39	5,5	297	41,8		
Плиса	2x=14	809	784	96,9	25	3,1	_	_		
A	4x=28	1117	781	69,9	192	17,2	144	12,9		
Алькора	2x=14	859	816	95,0	43	5,0	_	_		
20000000	4x=28	845	653	77,3	58	6,8	134	15,9		
Зарница	2x=14	779	768	98,6	11	1,4	_	_		
105	4x=28	1245	600	48,2	57	4,6	588	47,2		
Юбилейная	2x=14	839	810	96,5	29	3,5	_	_		
Construction	4x=28	_	_	62,0*	_	8,5*	_	29,5*		
Среднее	2x=14	_	_	96,8	_	3,3	_	_		

^{* –} различия достоверны при p < 0.05

Необходимо отметить, что у тетраплоидной ржи Зарница (рис. 2) наиболее высокий показатель фертильности пыльцы по сравнению с другими тетраплоидами. Пониженная фер-

тильность аутотетраплоидов ржи обусловлена гаметической и зиготической стерильностью. В гаметической стерильности различают пыльцевую стерильность, стерильность ма-

кроспор и зародышевых мешков. Гаметическая стерильность и неполноценность гамет в значительной степени определяются наруше-

ниями мейоза, которые возникают в результате дисбаланса генетической системы контроля мейоза у индуцированных аутополиплоидов.

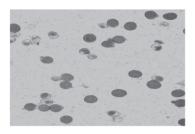


Рис. 2. Пыльца тетраплоидной формы Зарница (RRRR, 4x=28)

По белкам-маркерам можно оценивать три главных типа изменчивости: геномную, генную и аллельную. Геном как генетическая система особенно отчетливо выражен на уровне вида, и для его идентификации и экспрессии наиболее эффективны видоспецифичные запасные белки. У ржи такими белками являются секалины.

С целью выявления различий в экспрессии генетических систем геномов новых тетрапло-

идных форм озимой ржи в сравнении с исходными диплоидными сортами проведен электрофорез запасных белков секалинов семян.

У изученных генотипов ржи идентифицировано 66 типов спектра секалина зерновок, неравномерно распределенных среди диплоидных сортов и тетраплоидных форм: от 7 до 19, в зависимости от сорта и формы, для каждого из которых характерен специфический состав (табл. 4).

Таблица 4

Состав и интенсивность компонентов секалина у исходных диплоидных сортов
и тетраплоидных форм озимой ржи

Диплоидные сорта и	Состав и инт	енсивность пол	ипептидов секалина
тетраплоидные формы	β	γ	ω
Зарница (RRRR, 2n=28)	<u>1</u> 2 <u>34</u> 5	45	2 <u>34</u> 5 78910111213
Зарница(RR, 2n=14)	23 <u>45</u>	5	234 7891011
Юбилейная(RRRR, 2n=28)	123 <u>45</u>	1 45	12 <u>34</u> 567 <u>8</u> 9101112
Юбилейная (RR, 2n=14)	2 <u>345</u>	5	234 78 1011
Алькора (RRRR, 2n=28)	23 <u>45</u>	5	1234 67 891011
Алькора(RR, 2n=14)	23 <u>45</u>	1	
Плиса (RRRR, 2n=28)	234 <u>5</u>		
Плиса (RR, 2n=14)	23 <u>45</u>		234 7891011

Для всех ЭФ-спектров секалина изучаемых сортов и форм ди- и тетраплоидной озимой ржи (рис. 3, табл. 4) характерно наличие совместно наследуемого триплета компонентов

ω 234, кодируемых кластером генов, локализованных в коротком плече 1R хромосомы, а также 45 компонента в β-зоне. Внутрисортовой полиморфизм секалина у исследуемых

сортов и форм проявляется по компонентам β -, γ - и ω -зон. Сорта и формы отличаются друг от друга соотношением типов спектра секалина и интенсивностью отдельных ком-

понентов, причем в сорте или форме, как правило, преобладает 2-3 характерных для них ЭФ-типа.

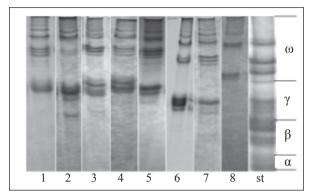


Рис. 3 Электрофоретические спектры секалина диплоидных сортов и созданных на их основе тетраплоидных форм озимой ржи: 1 – Зарница (RRRR, 4n=28); 2 – Зарница (RR, 2n=14); 3 – Алькора (RRRR, 4n=28); 4 – Алькора (RR, 2n=14); 5 – Юбилейная (RRRR, 4n=28); 6 – Юбилейная (RR, 2n=14); 7 – Плиса (RRRR, 2n=28); 8 – Плиса (RR, 2n=14). St – стандартный спектр (пшеница Кавказ)

Наибольшей изменчивости подвержены компоненты ω -зоны. У ряда генотипов отмечена элиминация компонентов ω 7, ω 11, ω 12, появление ω 1 и ω 6. В β -зоне часто происходит элиминация компонентов β 1, β 2 и β 3.

Сравнение ЭФ-спектров секалина показало, что у тетраплоидных форм внутрисортовой полиморфизм значительно шире и достигает 10-19, у исходных диплоидных сортов — от 7 до 10 типов спектра. В электрофоретическом спектре секалина большинства тетраплоидных генотипов появляются γ4 и γ5 компоненты, отсутствующие у исходных диплоидных сортов, а компонент γ1, присущий исходному диплоидному гибриду, может быть элиминирован у полученного тетраплоида. У ряда тетраплоидов наблюдается появление в ЭФ-спектре компонентов ω1213, не выявленных у исходных диплоидов.

Современные молекулярно-генетические методы позволяют исследовать внутривидовой и межвидовой полиморфизм ДНК с целью изучения специфичности генома, генетического маркирования и идентификации селекционного материала [11].

Для выявления изменений на уровне ДНК, произошедших в результате дупликации генома, проведен RAPD-анализ ДНК тетраплоидных форм и исходных диплоидных сортов озимой ржи.

Результаты молекулярно-генетического анализа созданных тетраплоидных форм озимой ржи с использованием RAPD-метода представлены в табл. 5 и на рис. 4, 5.

С использованием RAPD-метода у исследуемых сортов и форм ди- и тетраплоидной ржи выявлено по 66 фрагментов ДНК соответственно. Число амплифицированных фрагментов ДНК (ампликонов) в суммарной выборке растений варьировало от 6 до 12 в зависимости от праймера, их размер составлял от 300 до 3000 п.н. (табл. 5). В среднем при RAPD-анализе ДНК анализируемых образцов ржи один праймер инициировал синтез 8 фрагментов ДНК. Из 8 праймеров наиболее эффективными для озимой ржи оказались ОРА 5 и Р 36. С их помощью в изученных ди- и тетраплоидных популяциях выявлено 10 и 11 фрагментов ДНК соответственно (рис. 4, 5).

Наличие до 80,0% полиморфных фрагментов ДНК в спектрах исследуемых генотипов демонстрирует относительно высокий внутриподвидовой и индивидуальный полиморфизм у ди- и тетраплоидов ржи, который объясняется присутствием в их геномах высокоповторяющихся последовательностей ДНК.

Специфических фрагментов ДНК, которые являлись бы видоспецифическими маркерами и могли бы использоваться в генотипировании диплоидов или тетраплоидов, не обнаружено (рис. 4, 5).

Таблица 5

Характеристика праймеров и амплифицированных с их помощью фрагментов ДНК у растений тетраплоидной ржи, полученных в результате полиплоидизации диплоидных сортов

		Размер		Число фр	рагментов			
RAPD- праймер	Нуклеотидная последовательность	фраг-	Учитыва	аемых	_	Полиморфных (всего/частота, %)		
пранмер	последовательность	п. н.	Диплоиды	Тетра- плоиды	Диплоиды	Тетра- плоиды		
OPA 5	AGGGGTCTTG	400-2000	10	10	6/60,0	6/60,0		
OPA 20	AGGTCTTGGG	500-2500	7	8	3/42,8	4/50,0		
OPV 02	CTGAGGTCTC	300-1500	6	6	3/50,0	3/50,0		
P 136	AGCCTCGATT	500-2000	8	8	5/62,5	6/75,0		
P 36	CCGAATTCGC	700-2800	9	10	7/77,8	8/80,0		
P 39	CCAGTTCGCC	800-3000	6	6	4/67,6	3/50,0		
АРГ 22	TCGCCCCATT	380-1900	8	7	5/62,5	4/57,1		
B 220700	GTCGATGTCG	380-2500	12	11	9/75,0	8/72,7		
Всего	_	_	66	66	42/63,6	42/63,6		

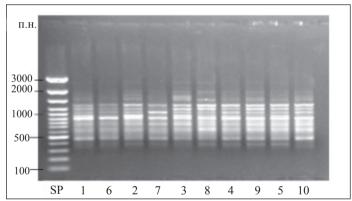


Рис. 4 RAPD-спектр амплифицированных фрагментов ДНК растений ди- (1 — Алькора, 2 — Плиса, 3 — Зарница, 4 — Юбилейная, 5 — Заречанская зеленоукосная) и тетраплоидной (6 — Алькора-тетра, 7 — Плиса тетра, 8 — Зарница-тетра, 9 — Юбилейная-тетра, 10 — Заречанская зеленоукосная-тетра) озимой ржи, полученный с использованием праймера ОРА 5.

SP — фрагменты ДНК с известным числом пар оснований

Электрофоретический анализ амплифицируемых фрагментов ДНК созданных тетрааналогов в сравнении с их исходными диплоидными сортами в 70% случаев выявил существенные различия в спектрах. У тетраплоидов у 25% спектров обнаружено появление 1-3 фрагмента ДНК размером от 300 до 4000 п.н., отсутствующих у исходных диплоидных сортов. RAPD-анализ выявил у тетраплоидов потерю (20%) или одновременно потерю и появление (30%) отдельных полиморфных фрагментов ДНК. Чаще элиминировали фрагменты ДНК размером от 700 до 1700 п.н. (рис. 4, 5).

Обнаруженные различия в спектрах амплифицированных фрагментов ДНК диплоидов и тетраплоидов свидетельствуют о структурных изменениях генома ржи при дупликации [18, 19]. Они могут быть обусловлены [20, 21]:

- структурными изменениями ДНК в результате ее избыточности при дупликации генома;
- дифференциальной элиминацией и диверсификацией генов дублированного генома;
- перегруппировкой последовательностей ДНК, метилированием ДНК;
- блочными перестройками, которые приво-

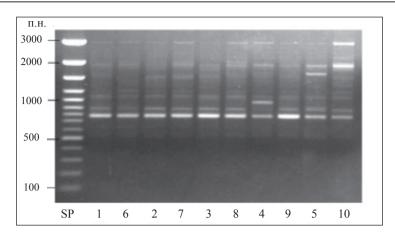


Рис. 5 RAPD-спектр амплифицированных фрагментов ДНК растений ди- (1 — Алькора, 2 — Плиса F1, 3 — Зарница, 4 — Юбилейная, 5 — Заречанская зеленоукосная) и тетраплоидной (6 — Алькора-тетра, 7 — Плиса тетра, 8 — Зарница-тетра, 9 — Юбилейная-тетра, 10 — Заречанская зеленоукосная-тетра) озимой ржи, полученный с использованием праймера P36.

SP - фрагменты ДНК с известным числом пар оснований

дят к комбинированию фрагментов из разных генов и к появлению белков с разными функциями при дупликации генома.

На рис. 6 представлены основные генетиче-

ские эффекты дупликации генома у озимой ржи. Выявленные факторы оказывают влияние на степень проявления морфологических и хозяйственно полезных признаков полиплоидов [22].

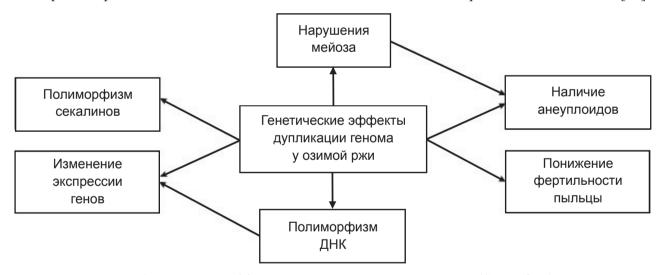


Рис. 6 Генетические эффекты дупликации генома у озимой ржи (S. cereale L.)

Заключение

Проведенные исследования эффектов дупликации генома у озимой ржи на клеточном (кариотип, процесс мейоза, фертильность пыльцы), белковом (полиморфизм запасных белков семян секалинов) и на уровне ДНК (полиморфизм ядерной ДНК) позволили сделать ряд выводов:

индуцированные с использованием закиси азота (N₂O) 28-хромосомные растения озимой ржи являются геномно сбалансированными аутотетраплоидами (RRRR,

- 4x=28) и не содержат видимых структурных изменений хромосом. Уровень содержания анеуплоидов в их потомстве относительно низкий (до 9,7%) и представлены они, в основном, 27-хромосомными гипотетраплоидами;
- в ранних поколениях (N2-N3) аутотетраплоидов озимой ржи, индуцированных закисью азота (N₂O), выявлена достоверно (p < 0.050) более высокая частота нару-

шений мейоза по сравнению с исходными диплоидами, что связано с нарушением тонко сбалансированной у диплоидов генетической системы контроля мейоза. Количество материнских клеток микроспор с нарушениями у тетраплоидов варьировало в зависимости от стадии мейоза от 9,9 до 22,2%, у диплоидов – от 1,5 до 3,1%;

- дупликация генома у ржи может приводить к элиминации отдельных компонентов секалина, присущих исходным диплоидным сортам, проявлению новых компонентов, не выявленных у исходных сортов, а также к значительному увеличению сортового полиморфизма ЭФспектра секалина у тетраплоидов, что обусловлено изменениями экспрессии дуплицированных генов;
- RAPD-анализ полиморфизма ядерной ДНК у тетраплоидных форм и исходных диплоидных сортов озимой ржи выявил

существенные различия в их электрофоретических спектрах. У тетраплоидов обнаружено появление 1-3 фрагментов ДНК размером от 300 до 4000 п.н., отсутствующих у исходных диплоидных сортов, а также элиминация отдельных фрагментов ДНК. Чаще элиминировали фрагменты ДНК от 700 до 1700 п.н. Выявленные различия в электрофоретических спектрах амплифицированных фрагментов ДНК у тетраплоидов свидетельствуют о структурных изменениях ДНК при дупликации генома ржи.

Таким образом, дупликация генома у ржи приводит к нарушению генетической системы регуляции мейоза (sy1, sy9 sy10, sy18, sy19), изменению экспрессии генов видоспецифических запасных белков семян (секалинов) и к структурным изменениям ДНК, что оказывает влияние на проявление признаков и свойств у полиплоидов.

Список использованной литературы

- 1. Жуковский, П.М. Эволюция культурных растений на основе полиплоидии / П.М. Жуковский // В кн: Полиплоидия и селекция. Москва-Ленинграл. 1963. С. 5–10.
- 2. Оно, С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции / С. Оно // под ред. и с предисл. д-ра биол. наук. Б.Н. Сидорова. М.: «Мир», 1973. 227 с.
- 3. Тороп, А.А. Направления, методы и результаты селекции озимой ржи в Центрально-Черноземной зоне / А.А. Тороп, В.Г. Дедяев, В.В. Чайкин // Новые методы селекции озимых колосовых культур. Уфа, 2001. С. 48–54.
- 4. Adams, K.L. Polyploidy and genome evolution in plants / K.L. Adams, J.F. Wendel // Curr. Opin. PlantBiol, 2005. V. 8. P. 135–141.
- 5. Wendel, J. Genome evolution in plants / J. Wendel // Plant. mol. boil, 2000. P. 225–249.
- 6. Adams, K.L. Organ-specific silencing of duplicated genes in a new synthesized cotton allotetraploid / K.L. Adams, R. Percifield, J. Wendel // Genetics, 2004, №168. P. 2217–2226.
- 7. Стегний, В.Н. Пространственная организация хромосом в ядре. Эпигенетические и эволюционные аспекты / В.Н. Стегний // Факторы экспериментальной эволюции организмов:

- сб. науч. ст. Т. 10. Киев: Логос, 2011. С. 73–78.
- 8. Белько, Н.Б. Создание тетраплоидных форм озимой ржи с использованием закиси азота и генетические эффекты дупликации генома / Н.Б. Белько, И.А. Гордей, И.С. Щетько, И.С. Гордей // Факторы экспериментальной эволюции организмов: сб. науч. ст. Т. 10 Киев: Логос, 2011. С. 14–19.
- 9. Бадаева, Е.Д. Изменение хромосом ржи в кариотипе тритикале: дис.... канд. биол. наук: 03.00.15 / Е.Д. Бадаева. М., 1984. 181 с.
- 10. Конарев, В.Г. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / В.Г. Конарев, И.П. Гаврилюк, Н.К.Губарева и др. Санкт-Петербург, 2000. С. 38–48.
- 11. Сиволап, Ю.М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю.М. Сиволап, Н.Э. Кожухова, Р.Н. Календарь. Одесса: «Астропринт», 2011. С. 49–74.
- 12. Куварин, В.В. Цитологическая и селекционная особенность анеуплоидов и реверсивных диплоидов ржи / В.В. Куварин // Тез. докл. IY Всесоюзного совещания по полиплоидии. Киев, 1975. С. 63–64.

- 13. Шкутина, Ф.М. Мейоз у отдаленных гибридов и амфиплоидов / Ф.М. Шкутина // В сб.: Цитология и генетика мейоза. М., 1975. С. 28–36.
- 14. Moens, P. Molecular perspectives of chromosome pair in gatmeiosis // Bioessays, 1994. Vol. 16, №2. P. 101–106.
- 15. Соснихина, С.П. Изучение генетического контроля мейоза у ржи / С.П. Соснихина, Ю.С. Федотова, В.Г. Смирнов, Е.И. Михайлова, Ю.Ф Богданов. Генетика, 1994. Т.30. С. 1043–1056.
- 16. Национальный Интернет-портал РФФИ [Электронный ресурс] / Книги, изданные при поддержке РФФИ Режим доступа: http://www.rfbr.ru/old/pub/knigi/janus/golub.htm. Дата доступа: 12.03.2010.
- 17. Долматович, Т.В. Молекулярно-генетический анализ и картирование мейотических мутаций у ржи (*Secale cereale* L.): автореф. дис......канд. биол. наук: 03.01.07 / Т.В. Долматович. Минск, 2011. 21 с.
 - 18. Madlung, A. Remodeling of DNA methyla-

- tion and phenotypic and transcriptional changes in synthetic Arabidopsis allotetraploids / A. Madlung, R. Masuelli, B. Watson and others // Plant Physiol., 2002. P. 733–746.
- 19. Pontes, O. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid Arabidopsis suecica genome / O. Pontes, N. Neves, M. Silva and others // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004. V. 101. P. 18 240–18 245.
- 20. Wang, J. Stochastic and epigenetic chandes of gene expression in Arabidopsis poliploids / J. Wang, L. Tian, A. Madlung and others // Genetics, 2004. №167. P. 1961–1973.
- 21. Luciano, G. A comprehensive analysis of gene expression alterations in a new synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid / G. Luciano, A. Juan-Pablo, S. Juliana and others // Plant Sci, 2005. P. 211–220.
- 22. Урбан, Э.П. Озимая рожь в Беларуси: селекция, семеноводство, технология возделывания / Э.П. Урбан. Минск: «Беларуская навука», 2009. 269 с.

Дата поступления статьи 17 октября 2011 г.

Ю.В. Полюхович, Е.В. Воронкова, А.В. Савчук, А.П. Ермишин

ХАРАКТЕРИСТИКА ГИБРИДОВ МЕЖДУ 2 EBN ВИДОМ-ПОСРЕДНИКОМ SOLANUM VERRUCOSUM И 1 EBN ДИПЛОИДНЫМИ ВИДАМИ КАРТОФЕЛЯ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, Академическая, 27

Введение

Наиболее перспективное направление интрогрессии генофонда диких видов в селекционный материал картофеля включает гибридизацию их с дигаплоидами S. tuberosum, проведение отбора на диплоидном уровне и мейотическое удвоение числа хромосом у отобранных клонов [1, 2]. Дигаплоиды S. tuberosum (2n=2x=24) относительно легко скрещиваются со многими диплоидными дикими видами картофеля, произрастающими в Южной Америке. Однако существует ряд интересных для селекции диких видов картофеля (мексиканские диплоидные виды из секций Bulbocastana, Pinnatisecta, Polyadenia, южноамериканские виды S. commersonii и S. circaeifolium и другие), которые не скрещиваются с дигаплоидами S. tuberosum либо дают потомство, которое сложно использовать в селекционном процессе.

Проблемы получения гибридов с участием этих видов обусловлены, прежде всего, гибелью гибридных зародышей вследствие недоразвития эндосперма и связаны с понятием EBN (endosperm balance number – балансового числа эндосперма). Каждому виду предписывается определенный специфический показатель (его EBN), значение которого определяет его поведение при гибридизации с другими видами. Дигаплоиды культурного картофеля S. tuberosum имеют 2 EBN, названные выше диплоидные дикие виды – 1 EBN. А для успешной гибридизации EBN родительских форм должны совпадать. Кроме того, для диплоидных видов картофеля из Мексики при гибридизации их с дигаплоидами S. tuberosum характерны также презиготные барьеры несовместимости, которые проявляются в виде ингибирования роста пыльцевых трубок в пестике [3]. 1 EBN диплоидные дикие виды относят к группе

1 EBN диплоидные дикие виды относят к группе наиболее древних в систематическом отношении форм картофеля [4]. Считается, что 2 EBN виды произошли от них в результате некой мутации, связанной с изменением EBN без изменения плоидности [4, 5]. Нами была предложена гипотеза, согласно которой подобная мутация (или мутации) до настоящего времени присутствуют в генофонде 1 EBN видов. Следовательно, в пуле пыльцы образцов 1 EBN видов наряду с обычными, 0,5 EBN пыльцевыми зернами, могут присутствовать отдельные нетипичные 1 EBN пыльцевые зерна [6].

На основании этой гипотезы нами разработаны подходы по вовлечению в селекцию ценного генофонда 1 EBN диплоидных диких видов. Они предполагают использование в качестве видапосредника дикого диплоидного самосовместимого вида *S. verrucosum* в скрещиваниях с 1 EBN диплоидными видами картофеля, что дает возможность устранить презиготные барьеры несовместимости (*S. verrucosum* не содержит пестичных S-PHKa3), а также дополнительного опыления цветков (через сутки после основного) пыльцой *S. phureja* IvP 35 для предотвращения осыпания малосемянных ягод. Реализация данных подходов на практике позволила нам получить большое количество жизнеспособных выполненных семян [7].

Целью настоящей работы была характеристика гибридов между *S. verrucosum* и 1 EBN дикими диплоидными видами картофеля для подтверждения гибридности и предварительной оценки их селекционной ценности.

Материалы и методы

В качестве материала использовали гибридные сеянцы, выращенные из семян, полученных в скрещиваниях между 12 образ-

цами *S. verrucosum* (PI 190170, PI 195171, PI 195172, PI 275256, PI 275257, PI 310966, PI 498010, PI 570643, PI 570644, PI 570645,

РІ 545745, РІ 498060), и образцами диплоидных 1 ЕВN видов картофеля из Мексики S. pinnatisectum (РІ 275231-275236, РІ 537023), S. polyadenium (РІ 230480, РІ 275238, РІ 347770, РІ 498036), S. bulbocastanum (РІ 243505, РІ 243506, РІ 243512, РІ 243513, РІ 255516, РІ 275191, РІ 275192, РІ 498011), и Южной Америки: S. commersonii (РІ 275168, РІ 275169, РІ 275265, РІ 458319, РІ 472844, РІ 472845) и S. circaeifolium (РІ 498116-РІ 498118, РІ 545973). Семена образцов диких видов были получены из Национального генного банка по картофелю США – NRSP-6 (в скобках после названий видов приведены регистрационные номера образцов в этом банке).

Семена, полученные в скрещиваниях 2009 г., проращивали в плошках с торфогрунтом в конце апреля-начале мая 2010 г., предварительно замочив на 12 ч в водном растворе гиббереллина (100 мг/л). Рассаду с 5-6 настоящими листьями высаживали в горшочки с торфогрунтом (1 л), которые размещались на расстоянии 0,3 м друг от друга на участке, расположенном между двумя теплицами, оборудованном устройством для мелкокапельного полива. Учитывали морфологические признаки растений, функциональную фертильность пыльцы, а также способность к клубнеобразованию и массу клубней с растения (если клубнеобразование имело место).

Часть сеянцев (11 случайно выбранных до цветения и 4 отобранных по морфологии цвет-ка гибридов *S. verrucosum* × *S. bulbocastanum*, всего 15 растений), а также родительские формы (образцы *S. verrucosum* и *S. bulbocastanum*) были проанализированы на предмет наличия у них видоспецифических RAPD-маркеров *S. bulbocastanum*, а также наличие маркера гена *Rpi-blb1* устойчивости к фитофторозу *S. bulbocastanum*.

Выделение и очистку ДНК исследуемых образцов проводили из листьев растений накануне или в фазу цветения с помощью набора реагентов Genomic DNA Purification Kit («Fermentas», Литва) по методике, предложенной производителем. Реакционная смесь для одной ПЦР-реакции при проведении RAPD-анализа в пересчете на 10 мкл содержала: 1 мкл 10× буфера для ПЦР, «DIALAT Ltd» (г. Москва, Россия); 0.2 µМ праймера; 4 mM MgCl₂; 0.2 mM каждого dNTP;

1U BioRedTagpolymerase или BioTagpolymerase, «DIALAT Ltd» и 20 ng ДНК исследуемого образца. Реакции амплификации осуществляли на автоматическом программируемом термоциклере GeneAmp PCR System 2700, «РЕ Applied Biosystems» (США). Программа для ПЦР-реакции: денатурация – 5 мин при 94 °C; далее 35 циклов по 30 сек при 94 °C, 30 сек при 36 °C и 1мин при 72 °C; финальная элонгация в течение 7 мин при температуре 72 °C. Использовали праймеры ОРА-04, ОРА-15, ОРА-18, OPC-06, OPC-19 (Operon Technologies, Alameda, CA), которые, по данным литературы, могут амплифицировать ДНК-маркеры, специфичные для S. bulbocastanum [8]. Длину амплифицированных фрагментов ДНК определяли при помощи стандартного маркера длин фрагментов ДНК 100 bp + 1.5 Kb + 3 Kb (M27)(«DIALAT Ltd»). Для горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия брали 7-8 мкл реакционной смеси и 2 мкл 10× бромфенолового-синего. Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1×TAE-буфере в течение 1,5-2 ч при напряжении в 80 V и силе тока 6mA.

Для детекции гена *Rpi-blb1* устойчивости к фитофторозу *S. bulbocastanum* использовали SCAR-маркер RGA2 [9]. Состав реакционной смеси: в пересчете объема на 10 мкл: 1 мкл 10 × буфера без MgCl₂; 0.4 µМ праймеры (прямой и обратный); 2,5 mM MgCl₂; 0.25 mM каждого dNTP; 1U BioRedTaqpolymerase или ВіоТаqроlymerase («DIALAT Ltd») и 50 пg ДНК исследуемого образца. Программа для ПЦР: начальная денатурация в течение 7 мин при 95 °C; далее 38 циклов по 20 сек при 95 °C, 20 сек. при 68 °C и 2 мин при 72 °C; финальная элонгация в течение 7 мин при температуре 72 °C.

Межвидовые гибриды в 2010 г. скрещивали с диплоидными клонами культурного картофеля. Для этого использовали в качестве опылителей вторичные дигаплоиды *S. tuberosum* 881-10, 882-5, 883-6, 895-40 (получены на основе дигаплоидов сортов Юбель, Полесский розовый, а также клона A15 *S. chacoense*), отобранные в ходе специальной селекции по высокой функциональной фертильности пыльцы [10]. Первичные дигаплоиды сорта Carlita (Нидерланды), а также диплоидные селекционные формы 08/18.1, 08/18.2, 08/28.1, 08/28.2,

созданные на основе диплоидных гибридов между дигаплоидами *S. tuberosum* и аллотетраплоидными видами *S. acaule* и *S. stoloniferum* [11], использовали в качестве материнских форм для опыления пыльцой фертильных межвидовых гибридов. В начале периода скрещиваний 2010 г. были благоприятные условия

для гибридизации: умеренно теплая погода с частыми дождями. Однако затем наступил продолжительный период экстремально высоких температур (более 30 °C), что привело к резкому снижению фертильности опылителей.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ «Statistica».

Результаты и обсуждение

Всхожесть гибридных семян, особенности морфологии гибридных сеянцев и родительских видов

Большинство гибридных семян, полученных в

2009 г., обладало высокой выполненностью и жизнеспособностью, их всхожесть составила от 47% у гибридов *S. verrucosum* × *S. polyadenium* до 88% у гибридов *S. verrucosum* × *S. pinnatisectum* (табл. 1).

Таблица 1 Всхожесть семян, клубнеобразование и фертильность гибридов F_1 между S. verrucosum и 1 EBN дикими видами картофеля (Минск, 2010 г.)

		Образ	зование клу	бней	Фертильность					
Гибриды	Всхожесть семян, %	Изучено растений, шт	Способность к образованию клубней	Масса клубней с растения	Изучено растений, шт	ФФП,	Стерильных и низкофертиль- ных,* %	Среднеферти- льных,***	Высокофертиль- ных,***%	Завязали ягоды при свободном опылении
S. verrucosum × S. bulbocastarum	50,0	24	54,2	2,9	18	7,14	55,6	22,2	22,2	_
S. verrucosum × S. pinnatisectum	88,1	24	62,5	3,3	23	8,98	34,8	30,4	34,8	58,3
S. verrucosum × S. polyadenium	46,4	24	83,3	2,9	22	6,06	63,6	0	36,4	_
S. verrucosum × S. commersonii	68,0	41	41,5	3,4	27	3,43	74,0	11,1	14,9	_
S. verrucosum × S. circaeifolium	66,2	14	21,4	0,4	11	7,31	63,7	9,0	27,3	33,3
Итого (средняя)	63,0	127	54,0	3,1	101	6,40	58,4	14,9	26,7	_

^{*} – пыльца не образуется, или ФФП ниже 2,0%;

Растения родительского вида *S. verrucosum* в фазу цветения имели высоту 20-40 см. Стебель и черешки листьев с антоциановой окраской. Листьев 2-5, парные, конечная доля несколько крупнее боковых. Венчик колесовидной формы, темно-сине-фиолетовый.

Растения 1EBN дикого вида картофеля *S. bulbocastanum* имели высоту 40-80 см. Листья толстые, цельные, густо опушенные. Венчик звездчатый, глубоко рассеченный, окраска кремовая. Было высеяно 100 семян гибридов *S. verrucosum* × *S. bulbocastanum*, взошло

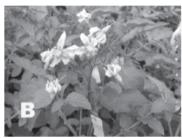
^{** –} $\Phi\Phi\Pi$ от 2,1 до 10,0%;

^{*** -} ФФП более 10%.

50 (50%). Сеянцы в фазе 5-6 листьев имели более округлую форму листовой пластинки, по сравнению с *S. verrucosum*. Они развивались быстрее, чем материнский родительский вид, на всех этапах развития превосходили его по мощности. В открытый грунт были высажены 24 гибридных сеянца. Высота сеянцев в фазу цветения была около 50 см. Пигментация стебля и черешков листьев отсутствовала у 9 сеянцев (37,5%), слабая пигментация была отмечена у

14 растений (58,3%), интенсивная окраска стеблей — у 1 сеянца (4,2%). У 3 растений (12,5%) бутоны осыпались, у остальных 21 (100%) наблюдалось расщепление по окраске цветков: белые цветки были у 2 растений (8,3%), светлоголубые — у 6 растений (25%), голубые — у 8 растений (33,3%), 5 растений (20,8%) имели темно-голубую и синюю окраску венчика. Некоторые гибриды имели звездчатые цветки, как у *S. bulbocastanum* (рис. 1).







Puc. 1. Различия в форме и окраске цветка у исходных диких видов и их гибридов $A-Solanum\ verrucosum,\ B-$ межвидовой гибрид $S.\ verrucosum\times S.\ bulbocastanum,\ C-Solanum\ bulbocastanum$

Растения 1EBN дикого вида картофеля S. pinnatisectum были 50-60 см высотой. Листья непарноперисторассеченные, доли листа ланцетовидные, узкие. Конечная доля близка по размерам боковым. Листья светло-зеленые, опушение короткое, редкое. Венчик белый, звездчатый. Было высеяно 59 семян гибридов S. verrucosum \times S. pinnatisectum, взошло 52 (88,14%). В открытый грунт было высажено 24 гибридных сеянца. Высота растений в фазу цветения – около 50 см. Слабая пигментация стебля отмечена у 11 сеянцев (45,83%), у остальных пигментация была выражена более сильно. По окраске цветка растения разделились на две группы по 12 растений (50%) с голубыми и синими цветками.

Растения 1EBN дикого вида картофеля *S. polyadenium* были мощные, высотой 80-100 см. Листьев 3-5, парные, конечная доля несколько крупнее боковых. Растения густоопушенные, с сильным неприятным запахом. Венчик колесовидный, белый. Было высеяно 56 семян, взошло 26, из них 1 растение было альбиносным. По внешнему виду сеянцы были ближе к *S. verrucosum*. В открытый грунт было высажено 24 гибридных сеянца. Высота растений в фазу цветения составляла около 40 см, кусты компактные, листовые пластинки более крупные и плотные по сравнению с

S. verrucosum. Наличие слабой антоциановой окраски стебля отмечено у 4 растений (16,7%), у всех остальных — без окраски. У 2 растений (8,3%) имело место осыпание бутонов, у остальных 21 (100%) наблюдалось расщепление по окраске цветков (все цветы имели колесовидную форму): темно-голубой венчик имели 3 растения (13,6%), голубой и светло-голубой — 13 (59%), белый — 6 (27,3%).

Растения 1 EBN дикого вида картофеля S. commersonii были компактные, розетковидные, высотой до 30 см. Листьев 3-5, непарноперисторассеченные, парные. Доли листа овально эллиптические, сидячие, опушенные. Венчик белый, звездчатый. Было высеяно 100 семян гибридов S. verrucosum \times S. commersonii, взошло 68. Сеянцы были довольно единообразны по внешнему виду, ближе к S. verrucosum. В открытый грунт был высажен 41 сеянец. У 8 растений (19,5%) отсутствовал пигмент на стебле и черешках листьев, остальные имели антоциановую окраску. У 14 растений (30%) цветы не развились, либо опадали бутоны. Среди остальных 27 (100%) наблюдалось расщепление по окраске цветков: синий венчик имели 13 растений (48%), голубой – 11 (40,7%), белый и светло-голубой – 3 (11,3%).

Растения 1EBN дикого вида картофеля *S. circaeifolium* были небольшие, до 40 см высотой. Листья простые или непарноперисто-

рассеченные, конечная доля крупнее боковых. Растения неопушенные, светло-зеленого цвета. Листья тонкие, блестящие. Венчик звездчатый, белый. Было высеяно 77 семян гибридов S. verrucosum \times S. circaeifolium, взошло 51 (66,23%). Сеянцы в фазе 4-5 листьев отличались сильно рассеченной листовой пластинкой и вытянутым, тонким стеблем (куст не компактный, в отличие от остальных межвидовых гибридов). В открытый грунт было высажено 14 сеянцев. Для всех растений было характерно наличие пигмента на стеблях и черешках листьев. У 1 растения (7,1%) не развились цветы, а еще у 2 (14,3%) интенсивность цветения была очень низкой (единичные цветы). Цветки у всех цветущих растений имели синюю окраску.

Jansky and Hamernik [12] предлагают проводить отбор гибридов между *S. verrucosum* и 1 EBN видами картофеля на уровне сеянцев по внешнему виду. При этом, по мнению авторов, имеется возможность отсеивать сеянцы материнского родителя *S. verrucosum*, по-видимому, полученные в результате самоопыления.

В настоящей работе гибридизации обязательно предшествовала кастрация (удаление пыльников) нераскрывшихся бутонов материнских форм. По данным Abdalla and Hermsen [13], у *S. verrucosum* высвобождение пыльцы происходит только из зрелых пыльников. В связи с этим вероятность нежелательного самоопыления крайне низка. Гибридные сеянцы на ранних стадиях развития по внешнему виду были ближе к *S. verrucosum*. По интенсивности роста они значительно превосходили родительские формы. На стадии цветения

наблюдалось расщепление по окраске цветка. По данным Kameraz et al. [14], гибриды F_1 между S. verrucosum и S. spegazzinii, S. verrucosum и S. chomatophilum по габитусу были ближе к материнской форме, в том числе по окраске цветков (венчик сине-фиолетовый), и лишь в F_2 наблюдали расщепление. Следовательно, отсеивание предположительно негибридных форм среди сеянцев S. verrucosum \times дикие виды картофеля на основании их морфологии и даже по окраске цветков не всегда может быть оправданным.

RAPD- и SCAR-маркеры у гибридов между S. verrucosum × S. bulbocastanum

Все использованные RAPD-маркеры, за исключением ОРА-18, были представлены у образцов мужского родительского вида S. bulbocastanum и отсутствовали у образцов второго родителя S. verrucosum, который выступал в скрещиваниях в качестве материнской формы. В связи с этим для подтверждения гибридности сеянца было достаточным детектировать у него маркер, специфичный для S. bulbocastanum. Из использованных RAPD-маркеров наиболее информативными оказались OPA-15 (590 bp) и OPC-06 (1050 bp), которые были представлены у 7 и 9 гибридов соответственно (рис. 2). При этом нечеткие полосы продуктов ампликафиции второго из названных маркеров были отмечены на электрофореграммах еще у 3 гибридов. В целом, у 13 из 15 проанализированных гибридов имелся хотя бы один из использованных RAPDмаркеров, а у оставшихся двух присутствие маркера ОРС-06 было нечетким.

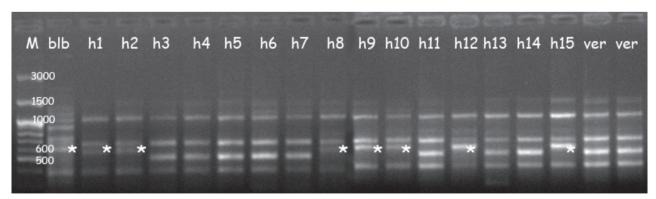


Рис. 2. RAPD-полиморфизм у родительских видов *S. bulbocastanum*, *S. verrucosum* и гибридов между ними при использовании праймера OPA15. 1 — маркер длин фрагментов ДНК; 2 — *S. bulbocastanum*; 3-18 — гибриды F_1 *S. verrucosum* \times *S. bulbocastanum*; 19 — *S. verrucosum*. Видоспецифический RAPD-маркер 590 п.н. (отмечен звездочкой) имеется у отцовского родителя *S. bulbocastanum* и у 7 из 15 изученных гибридов F_1 *S. verrucosum* \times *S. bulbocastanum*. Он отсутствует у материнской родительской формы *S. verrucosum*

SCAR-маркер RGA2 гена Rpi-blb1 устойчивости к фитофторозу был обнаружен у 6 из 8 образцов S. bulbocastanum, использованных в работе, и не был выявлен у образцов S. verrucosum. Его наличие было установлено у 4 гибридных сеянцев из 15 проанализированных. Интересно, что все эти сеянцы были отобраны в период цветения по окраске венчика (они имели, в отличие от материнской формы S. verrucosum, белые или светлоголубые цветки). Кроме того, у этих четырех гибридов наиболее полно были представлены специфичные для S. bulbocastanum RAPDмаркеры: OPA-04 (600bp) – у двух гибридов (еще у одного нечетко), OPA 15 (590 bp) – у трех гибридов, OPC-06 (1050 bp) и OPC-19 (1250 bp) – у всех 4-х гибридов.

Использование белковых или ДНКмаркеров для подтверждения гибридности межвидовых гибридов обычно практикуется в тех случаях, когда их происхождение остается неясным (например, при получении гибридов путем слияния протопластов), или когда удается получить единичные гибридные растения в скрещиваниях между практически несовместимыми видами. В настоящей работе было получено очень большое количество гибридных семян и растений в условиях, когда появление негибридных форм было маловероятным. Кроме того, большинство гибридных сеянцев заметно отличалось по морфологии от растений материнских форм S. verrucosum, особенно на стадии цветения. Тем не менее, чтобы окончательно убедиться в гибридности полученных растений, нами был проведен выборочный анализ ДНК сеянцев. Были выбраны гибриды с участием S. bulbocastanum – дикого вида, который имеет наиболее жесткие пре- и постзиготные барьеры несовместимости с дигаплоидами S. tuberosum [3].

Как видно из приведенных выше результатов, использование даже небольшого количества ДНК-маркеров четко продемонстрировало гибридное происхождение большинства проанализированных гибридов. Особенно это касается сеянцев, заметно отличающихся от материнских форм *S. verrucosum* по морфологическим признакам.

Показатели мужской фертильности гибридов между S. verrucosum и 1 EBN дикими видами картофеля

Многие из гибридных сеянцев, в отличие от S. verrucosum, сбрасывали бутоны (см. выше), имели стерильную или низкофертильную пыльцу (табл. 1). Особенно много стерильных форм было среди гибридов S. $verrucosum \times$ S. commersonii (74%). Функциональная фертильность пыльцы гибридов, которые ее образовывали, в целом была невысокой (менее 10%). Тем не менее, среди гибридов с участием всех изученных видов попадались растения с относительно высокой фертильностью пыльцы ($\Phi\Phi\Pi$ более 10%), которые можно было успешно использовать в скрещиваниях в качестве опылителей. Наибольшее количество мужски фертильных форм отмечено среди гибридов между S. verrucosum и S. polyadenium (36,4%), S. pinnatisectum (34,8%), a также S. circaeifolium (27,3%). Как следствие, гибриды с участием двух последних видов образовывали ягоды при свободном опылении с достаточно высокой частотой (58,3% и 33,3% соответственно).

Мужская стерильность межвидовых гибридов, полученных при использовании S. verrucosum в качестве материнской формы, является их характерной особенностью [13,15]. Полагают, что она является результатом взаимодействия специфического плазмона S. verrucosum и определенных плазмончувствительных ядерных генов многих видов картофеля. По данным Abdalla and Hermsen [15], такие гены в использованном авторами материале присутствовали в гомозиготном состоянии, поэтому все полученные межвидовые гибриды с S. verrucosum формировали стерильную пыльцу. В настоящем исследовании, несмотря на значительную долю мужски стерильных межвидовых гибридов (особенно среди гибридов с S. commersonii), было достаточно много гибридов с высокой функциональной фертильностью пыльцы (особенно среди гибридов с S. polyadenium и S. pinnatisectum). Мужски фертильные межвидовые гибриды с участием S. verrucosum были получены также Kameraz et al. [14] и Jansky and Hamernik [12]. Очевидно, плазмончувствительные ядерные гены могут быть представлены у диких видов не только в гомозиготном, но и гетерозиготном состоянии [16].

Клубнеобразование гибридов между S. verrucosum и 1EBN дикими видами картофеля

Большинство гибридов были не способны к образованию клубней в условиях длинного дня в Беларуси (табл. 1). Особенно много таких форм было среди гибридов S. verrucosum \times S. circaeifolium (75%). B tex случаях, когда клубни формировались, их было немного (2-5), при этом их масса также была невелика (0,5-1 г). Лучшие по этому показателю сеянцы: №75 S. verrucosum × S. commersonii (8 клубней, масса клубня с растения 27,7 г), №61 S. verrucosum × S. pinnatisectum (10 клубней, 14,1 г), №13 S. verrucosum × S. bulbocastanum (12 клубней, 12,8 г). Было заметно, что в момент уборки (в начале сентября) формирование клубней у гибридов только началось.

Пониженная способность к клубнеобразованию изучаемых межвидовых гибридов очевидно является существенным недостатком предложенного метода вовлечения в селекцию ценного генофонда 1 EBN диких диплоидных видов картофеля, так как существенно затрудняет их последующую оценку, гибридизацию с культурным картофелем.

Скрещиваемость гибридов между S. verrucosum и 1EBN дикими видами картофеля с дигаплоидами S. tuberosum

Успех интрогрессии ценного генофонда 1 EBN видов в селекционный материал определяется не только получением межвидовых гибридов с их участием, но и возможностью их беккроссирования культурным картофелем. В скрещивания в качестве материнских форм были включены преимущественно те гибриды, которые по внешнему виду, окраске и морфологии цветков заметно отличались от родительского вида S. verrucosum. До наступления жаркой погоды удалось опылить смесью пыльцы высоко фертильных дигаплоидов S. tuberosum от 3 (гибриды S. $verrucosum \times S$. commersonii) до 14 (гибриды S. verrucosum \times S. polyadenium) сеянцев. Гибриды S. $verrucosum \times S$. circaeifolium цвели скудно и в поздние сроки (после наступления жаркой погоды), поэтому в скрещивания с дигаплоидами S. tuberosum они не были включены. В тех случаях, когда удалось провести скрещивания между гибридами и дигаплоидами S. tuberosum, отмечена высокая завязываемость ягод: от 72,9% у гибридов $S. verrucosum \times S. polyadenium до 100% у гибридов$ S. verrucosum \times S. bulbocastanum \bowtie S. verrucosum \times S. commersonii (табл. 2).

Таблица 2 Скрещиваемость с дигаплоидами *S. tuberosum* гибридов F_1 *S.verrucosum* × 1 EBN дикие виды картофеля (Минск, 2010)

Гибриды	Опылено цветков, шт.	Ягод, шт.	Завязы- ваемость ягод, %	Семян, шт.	Семян на ягоду, шт.	Семян на опыление, шт.
S.verrucosum× S.bulbocastanum	17	17	100	1518	89,3	89,3
S.verrucosum× S.pinnatisectum	21	19	90,5	403	21,2	19,2
S.verrucosum× S.polyadenium	37	27	73	897	33,2	24,2
Итого	75	63	84	2818	44,7	37,6

Ягоды, как правило, содержали сравнительно много выполненных семян (среднее количество семян на ягоду — 44,7). Лишь три ягоды, которые завязались на гибридах *S. verrucosum* × *S. pinnatisectum* (одна на одном сеянце и две на другом), не содержали выполненных семян. Наиболее высокую скрещиваемость с дигаплоидами *S. tuberosum* имели гибриды *S. verrucosum* × *S. bulbocastanum* (89,3

семян на опыление). Интересно, что удалось получить семена (от 58 до 462 семян) у всех четырех гибридов, у которых был обнаружен маркер гена Rpi-blb1 устойчивости к фитофторозу от S. bulbocastanum.

В общей сложности в результате беккроссирования межвидовых гибридов дигаплоидами *S. tuberosum* было получено 2818 семян, эффективность гибридизации составила в среднем 37,6 семян на опыление. У гибридов *S. verrucosum* × *S. commersonii* в результате опыления 9 цветков завязалось 9 полновесных ягод, однако они были утрачены в процессе уборки, поэтому количество содержащихся в них семян не было определено.

Использование в скрещиваниях с дигаплоидами *S. tuberosum* межвидовых гибридов с высокой ФФП оказалось мало результативным. В общей сложности было опылено 173 цветка. Завязалось три ягоды от опыления 4 цветков диплоидной селекционной формы 08/18.2 (сложный гибрид между дигаплоидами *S. tuberosum* и аллотетраплоидными видами *S. acaule* и *S. stoloniferum*) и одним из гибридов *S. verrucosum* × *S.pinnatisectum*. В ягодах оказалось 26 выполненных семян (6,5 семян на опыление). Очевидно, неудача этих скрещиваний обусловлена явлением односторонней несовместимости, характерным для скрещиваний между самосовместимым видом *S. verrucosum* и самонесовместимыми диплоидными видами картофеля [17].

Таким образом, нами были получены ягоды и семена при опылении смесью пыльцы дигаплоидов S. tuberosum всех межвидовых гибридов, за исключением гибридов S. $verrucosum \times$ S. circaeifolium, которые не успели зацвести до наступления жары. Практически во всех случаях ягоды содержали выполненные семена. То есть, межвидовые гибриды, использованные в скрещиваниях в качестве материнских форм, имели 2 EBN. Лишь два сеянца $S. \ verrucosum \times S. \ pinnatisectum$ завязали при опылении пыльцой дигаплоидов S. tuberosum ягоды, не содержащие семян. По-видимому, эти сеянцы являются редкими inter-EBN формами, или несут какие-либо генетические факторы, связанные с нарушением развития эндосперма.

Заключение

Семена, полученные в результате гибридизации между 2 EBN самосовместимым видом картофеля S. verrucosum и 1 EBN диплоидными видами S. bulbocastanum, S. pinnatisectum, S. polyadenium, S. commersonii и S. circaeifolium, обладали высокой выполненностью и жизнеспособностью, их всхожесть составила от 47% до 88%. Гибридные сеянцы на ранних стадиях развития по внешнему виду были ближе к S. verrucosum. По интенсивности роста они значительно превосходили родительские формы. На стадии цветения наблюдалось расщепление по окраске цветка и функциональной фертильности пыльцы. Гибридность сеянцев $S. verrucosum \times S. bulbocastanum$ подтверждена с помощью RAPD-анализа, несколько гибридов имели ДНК маркер гена устойчивости к фитофторозу *Rpi-blb1*, который считается геном длительного действия, эффективного против широкого круга рас патогена. Для межвидовых гибридов, как и родительских видов, была характерна пониженная способность

к клубнеобразованию в условиях Беларуси. Большинство сеянцев межвидовых гибридов, в отличие от S. verrucosum, имели стерильную пыльцу, однако часть из них была достаточно фертильна, чтобы их можно было использовать в скрещиваниях в качестве опылителей. Были получены ягоды и семена при опылении смесью пыльцы дигаплоидов S. tuberosum всех межвидовых гибридов, за исключением гибридов S. verrucosum $\times S$. circaeifolium. Практически во всех случаях ягоды содержали выполненные семена. То есть, межвидовые гибриды, которые использовали в скрещиваниях в качестве материнских форм, имели 2 EBN. Обратные скрещивания с участием мужски фертильных гибридов оказались мало результативными. Полученные межвидовые гибриды и их беккроссное потомство представляют значительный интерес для селекции, поскольку с их помощью можно интрогрессировать в селекционный материал ряд ценных генов 1 EBN диких диплоидных видов картофеля.

Список использованных источников

- 1. Peloquin, S.J. Potato breeding with haploids and 2n gametes // S.J. Peloquin, G.L. Yerk, J.E. Werner, E. Darmo // Genome. 1989. Vol. 31. P. 1000–1004.
- 2. Jansky, S.H. Use of potato haploids to put 2x wild species germplasm in usable form / S.H. Jansky, S.J. Peloquin, G.L Yerk // Plant

- Breeding. 1990. Vol. 104. P. 290–294.
- 3. Маханько, О.В. Межвидовая несовместимость в диплоидной селекции картофеля / О.В. Маханько // Земляробства і ахова раслін. 2008. №1. С. 11–14.
- 4. Hawkes, J.G. Taxonomic and evolutionary implications of the endosperm balance number hypothesis in potatoes / J.G. Hawkes, M.T. Jackson // Theor Appl Genet. 1992. Vol. 84. P. 180–185.
- 5. Johnston, S.A. Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuberbearing Solanum species / S.A. Johnston, R.E. Jr. Hanneman // Am Potato J. 1980. Vol. 57. P. 7–14.
- 6. Yermishin, A.P. A new look at the problem of inter-EBN interspecific crosses in potato / A.P. Yermishin [et al.] // In: 18th Triennial Conference of the European Association for Potato Research. Ed. by J. Santala and J.P.T. Valkonen. Oulu, Finland. 2011 P. 71.
- 7. Полюхович, Ю.В. Эффективность гибридизации между *Solanum verrucosum* Schlechtd. и 1EBN дикими диплоидными видами картофеля с использованием приема доопыления цветков пыльцой *S. Phureja* IVP 35 / Ю.В. Полюхович [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2011. Т. 55, №3. С. 92—96.
- 8. Naess, S.K. Analysis of the introgression of *Solanum bulbocastanum* DNA into potato breeding lines / S.K. Naess [et al.] // Mol. Genet. Genomics. 2001. Vol. 265.– P. 694–704.
- 9. DNA markers for potato introgression breeding / M.P. Beketova [et al] // In: Potato production and innovative technologies. / Ed. by A.J. Haverkort and B. Anisimov. Wageningen, 2007. P. 397–405.
- 10. Лукша, В.И Результаты отбора по признаку «высокая функциональная фертильность пыльцы» и ряду селекционно-важных

- показателей в популяциях вторичных дигаплоидов $Solanum\ tuberosum\ L.\ /$ В.И. Лукша // Картофелеводство. Минск, 2010. Т. 17. C.137—148.
- 11. Воронкова, Е.В. Диплоидные гибриды между аллотетраплоидными дикими видами картофеля *Solanum acaule* Bitt., *Solanum stoloniferum* Schltdl. и дигаплоидами *Solanum tuberosum* L. / Е.В. Воронкова [и др.] // Генетика. 2007. Т. 43, №8. С. 882—890.
- 12. Jansky, S.H. The Use of *Solanum verrucosum* as a Bridge Species / S.H. Jansky, A.J Hamernik // Genetic Resources and Crop Evolution. 2009. Vol. 56, №8. P. 1107–1116.
- 13. Abdalla, M.M.F. An evaluation of *Solanum verrucosum* Schlechtd. for its possible use in potato breeding / M.M.F. Abdalla, J.G.Th. Hermsen // Euphytica. 1973. Vol. 22. P. 19–27.
- 14. Камераз, А.Я. Межвидовая гибридизация картофеля с участием дикорастущего диплоидного вида *S. verrucosum* Schlechtd. / А.Я Камераз [и др.] // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. − 1982. − Т. 73. №2. С. 56–65.
- 15. Abdalla, M.M.F. Unilateral incompatibility: hypotheses, debate and its implications for plant breeding / M.M.F. Abdalla, J.G.Th. Hermsen // Euphytica. 1972. Vol. 21. P. 32–47.
- 16. Лукша, В.И., Савчук, А.В., Воронкова, Е.В., Ермишин, А.П. Генноцитоплазматическая мужская стерильность гибридов между дигаплоидами *Solanum tuberosum* и диплоидными видами картофеля / В.И. Лукша [и др.] // Вести НАН Беларуси, сер. биол. наук. 2010. №4. С. 65–70.
- 17. Grun, P. The inheritance and expression of unilateral incompatibility in *Solanum /* P. Grun, M. Aubertin // Heredity. 1966. Vol. 21. P. 131–138.

Дата поступления статьи 1 ноября 2011 г.

Е.А. Ровба, О.Ю. Конева, С.Е. Дромашко

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОРОД КАРПА БЕЛОРУССКОЙ СЕЛЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Процесс определения генотипа индивидуума осуществляется с помощью нескольких молекулярно-генетических методик, таких как ПЦР, ДНК-секвенирование, гибридизация, ДНК-микрочипы и др. [1].

На сегодняшний день генетическая паспортизация как основа геномной регистрации ресурсных видов растений и животных, нуждается в использовании более рациональных подходов, основанных на молекулярном маркировании геномов. Применяемые для геномной регистрации человека SNP-маркеры не могут быть использованы для генетической паспортизации растений и животных из-за их дороговизны. В настоящее время для генетического типирования используются различные варианты молекулярных маркеров (RELF, RAPD, AFLP, ISSR, SSR или микросателлиты), каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки [2].

До сих пор геном такого важного с рыбоводческой точки зрения вида рыб, как карп, изучен крайне мало. GeneBank содержит весьма скудную информацию о некоторых участках генома карпа или отдельных генах [3]. Последовательность ДНК карпа до сих пор не отсеквенирована, хотя информация о геноме является крайне важной для проведения эффективных работ в области селекции карпа, оценки селекционного

потенциала той или иной породы карпа. Наличие подобной информации призвано ускорить селекционный процесс и оценку эффективности проведения селекции в направлениях хозяйственно ценных признаков, в частности, в таких важных направлениях, как продуктивность и устойчивость.

С помощью методов ДНК-типирования (RAPD-маркеры и микросателиты [4-8]) зарубежными исследователями в последние годы выявлена высокая геномная вариабельность некоторых европейских (Венгрия) и азиатских (Китай) пород карпа. В странах СНГ лишь в России проводились единичные исследования местных и европейских пород этой рыбы методом мультилокусного геномного типирования [9].

В Беларуси исследование генетического разнообразия пород карпа белорусской селекции впервые проведено нами с использованием RAPD-маркеров [10]. Оценка геномной вариабельности отечественных пород карпа с помощью SSR-маркеров, столь популярных при изучении растений и млекопитающих, не проводилась.

Целью данной работы стало изучение полиморфизма пород карпа белорусской селекции (лахвинская, тремлянская, изобелинская) с помощью микросателлитных маркеров.

Материалы и методы

Исследовалось генетическое разнообразие трех пород карпа белорусской селекции: лахвинская (чешуйчатая и зеркальная отводки), тремлянская (чешуйчатая и зеркальная отводки), изобелинская (отводки смесь зеркальная, смесь чешуйчатая, «Триприм» и «Столин XVIII»). Биологический материал (фрагменты плавников) отбирался у 2-3 годовалых особей (товарная рыба) в 2009-2010 гг.

ДНК выделялась из законсервированных в 96%-ном этаноле фрагментов плавников по стандартной фенол-хлороформной методике [11,12].

Таблица 1

Концентрацию компонентов ПЦР-смеси подбирали эмпирически: пробовали различные буферы (DreamTaq (Fermentas); Primetech и Fermentas с KCl; Primetech и Fermentas с $(NH_4)_2SO_4$, СибЭнзим $(NH_4)_2SO_4$)) и ДНК-полимеразы (DreamTaq (Fermentas), СибЭнзим, Primetech). Наилучшие результаты были продемонстрированы на ПЦР-буфере с $(NH_4)_2SO_4$ (Primetech, Беларусь) и Taq ДНК-полимеразе (Primetech, Беларусь). ПЦР-смесь объемом 25 мкл содержала: 10x ПЦР-буфере с

II

IV

 $(NH_4)_2SO_4$ (Primetech); 2,5 мМ MgCl₂, смесь 10x dNTP's; $\approx 0,03$ мкМ каждого праймера (прямой и обратный); 0,03 ед./мкл *Таq* ДНК-полимеразы (Primetech) и 1 мкл ДНК-матрицы. ПЦР производили на амплификаторе $C1000^{\text{TM}}$ Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Температурный режим амплификации представлен в табл. 1 [13, 14].

Микросателлитный анализ осуществляли с использованием праймеров, последовательность которых представлена в табл. 2 [13].

До ∞

Температурный режим амплификации

Количество Шаг Температура, °С Продолжительность циклов 95 5' Ι 1 30" Денатурация 95 52-58 45" Отжиг 35 90" Элонгация 72 III 72 10' 1

12

 Таблица 2

 Последовательность праймеров к исследуемым микросателлитным локусам

Название праймера	Последовательность
MFW16-F	5'-GTCCATTGTGTCAAGATAGAG-3'
MFW16-R	5'-TCTTCATTTCAGGCTGCAAAG-3'
MFW7-F	5'-TACTTTGCTCAGGACGGATGC-3'
MFW7-R	5'-ATCACCTGCACATGGCCACTC-3'
MFW28-F	5'-GATCCCTTTTGAATTTTTCTAG-3'
MFW28-R	5'-ACAGTGAGGTCCAGAAGTCG-3'
MFW31-F	5'-CCTTCCTCTGGCCATTCTCAC-3'
MFW31-R	5'-TACATCGCAGAGAATTCGTAAG-3'

Продукты амплификации (10 мкл реакционной смеси) разделяли в 2% агарозном геле (Тор Vision LE GQ, Fermentas) в 0,5х ТВЕ-буфере. Гель окрашивали этидиум бромидом (0,5 мкг/мл). Визуализацию гелей производили с помо-

щью системы гель-документирования GelDoc XR (Bio-Rad, США). Обработку и анализ гелей производили в программе Quantity One 4.4.0. Статистическую обработку результатов осуществляли в программе Statistica 6 (StatSoft, Inc.).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования по праймеру **MFW7** показали наличие 26 типов ампликонов (рис. 1). Анализ данных табл. 3 показал нали-

чие специфического ампликона у **тремлянской** зеркальной отводки — тип 7 (517 п.о.), который встречался в выборке с частотой 30,00%, может

^{* —} для праймера MFW28 температура отжига составляла 52 °C, для праймеров MFW7, MFW16 — 55 °C, для праймера MFW31 — 58 °C.

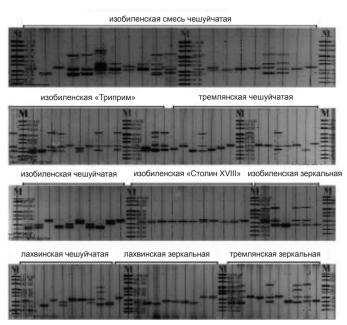


Рис. 1. Изображение агарозных гелей с продуктами амплификации у исследуемых пород карпа по микросателлитному локусу MFW7; M – маркер pUC Mix Marker, 8 (Fermentas)

быть использован в качестве дополнительной характеристики отводки породы, т.к. частота встречаемости достаточно высокая.

Также были обнаружены и другие специфические фрагменты по данному праймеру: у тремлянской чешуйчатой отводки — тип 8 (508 п.о.) и тип 14 (292 п.о.); у отводки изобелинская смесь зеркальная — тип 26 (176 п.о.); у отводки изобелинская смесь чешуйчатая обнаружено несколько специ-

фических ампликонов (667 п.о., 603 п.о., 581 п.о., 321 п.о., 304 п.о., 345 п.о.), но ни один из них не может быть использован для характеристики отводки породы из-за низкой частоты встречаемости.

Стоит отметить, что для лахвинской зеркальной отводки по праймеру MFW7 не было обнаружено специфических ампликонов, однако данная отводка характеризуется отсутствием ампликона типа 17, который присутствует у всех

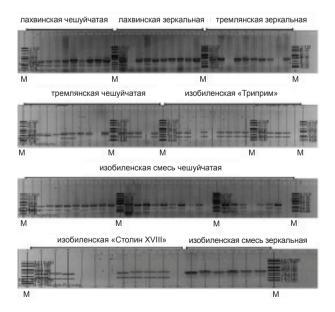


Рис. 2. Изображение агарозных гелей с продуктами амплификации у исследуемых пород карпа по микросателлитному локусу MFW28; М – маркер pUC Mix Marker, 8 (Fermentas)

других отводок исследуемых пород с частотой 22-72%, что может в свою очередь послужить дополнительной характеристикой данной отводки.

По праймеру MFW28 обнаружено 13 типов ампликонов (рис. 2). Анализ табл. 4 показал, что у большинства изученных отводок специфические ампликоны отсутствуют. Исключение составили две отводки: лахвинская чешуйчатая и изобелинская «Столин XVIII». У лахвинской чешуйчатой отводки обнаружены специфические ампликоны: тип 6 (282 п.о.), который встречался в выборке с частотой 30,77%, т.е. он может быть использован в качестве дополнительной характеристики отводки породы, т.к. частота встречаемости достаточно высокая, а также тип

7 (263 п.о.) с частотой 15,38% и тип 8 (238 п.о.) с частотой 23,07%. Однако, ампликоны типа 7 и типа 8 по праймеру **MFW28** не могут использоваться для характеристики отводки из-за довольно низкой частоты встречаемости.

Аналогично специфические ампликоны обнаружены у отводки изобелинская «Столин XVIII»: тип 1 (326 п.о.) с частотой встречаемости 57,14% (может быть использован в качестве дополнительной характеристики отводки породы, т.к. частота встречаемости высокая), а также тип 9 (219 п.о.) с частотой 14,29%, который в силу низкой частоты встречаемости не пригоден для характеристики отводки.

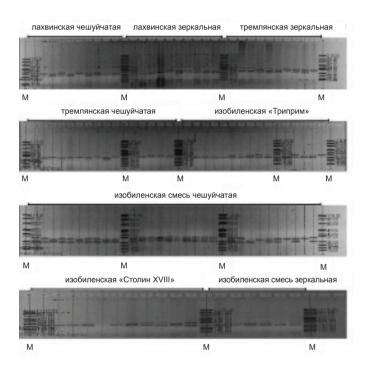


Рис. 3. Изображение агарозных гелей с продуктами амплификации у исследуемых пород карпа по микросателлитному локусу MFW31; M – маркер pUC Mix Marker, 8 (Fermentas)

Результаты исследования по праймеру MFW31 показали наличие 9 типов ампликонов (рис. 3), их количественная характеристика представлена в табл. 5. Анализ данных показал, что ни по одной из представленных отводок трех изученных пород не обнаружено специфических ампликонов.

В результате проведенных исследований, по праймеру **MFW16** обнаружено 18 типов ампликонов (рис. 4). Анализ данных, продемонстрированных в табл. 6, показал наличие специфических фрагментов у тремлянской

чешуйчатой отводки: обнаружены два специфических ампликона — тип 2 (651 п.о.) и тип 9 (326 п.о.); у изобелинской «Триприм» отводки обнаружены два специфических ампликона: тип 1 (778 п.о.) и тип 8 (342 п.о.), но частота встречаемости каждого из перечисленных выше типов ампликонов очень низкая (6,67%), следовательно, они не могут быть использованы для характеристики отводки.

Однако, по праймеру **MFW16** для лахвинской зеркальной отводки характерно полное

отсутствие ПЦР-фрагмента типа 13, который присутствует у всех остальных отводок ис-

следуемых пород карпа с частотой 10-66 %, что может служить маркером отводки.

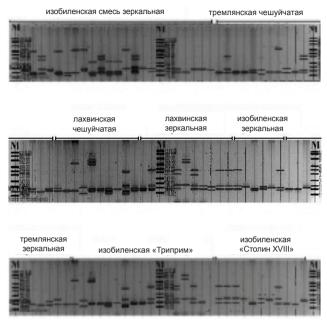


Рис. 4. Изображение агарозных гелей с продуктами амплификации у исследуемых пород карпа по микросателлитному локусу MFW16; М – маркер pUC Mix Marker, 8 (Fermentas)

Заключение

В результате проведенных молекулярногенетических исследований, для некоторых отводок изучаемых пород карпа были обнаружены специфические аллели по исследуемым микросателлитным локусам (MFW7, MFW16, MFW28, MFW31), которые могут быть использованы для генетической идентификации отводки (в качестве генетического маркера отводки) и для генетической паспортизации:

- для лахвинской чешуйчатой отводки был обнаружен специфический ампликон: тип 6 (282 п.о.) по праймеру MFW28, который встречался в выборке с частотой 30,77%;
- для лахвинской зеркальной отводки было обнаружено отсутствие ампликонов тип 17 (263-267 п.о.) по праймеру MFW7 и тип 13 (167-176 п.о.) по праймеру MFW16, которые встречаются у всех других пород и отводок;
- для тремлянской зеркальной отводки по праймеру MFW7 был обнаружен специфический ампликон: тип 7 (517 п.о.), который встречался в выборке с частотой 30,00%;

 для изобелинской «Столин XVIII» отводки обнаружен специфический ампликон: тип 1 (326 п.о.) по праймеру MFW-28 с частотой встречаемости 57,14%.

Для остальных отводок изучаемых пород карпа (тремлянская чешуйчатая, изобелинская смесь зеркальная, изобелинская смесь чешуйчатая, изобелинская «Триприм») по исследуемым микросателлитным локусам (MFW7, MFW16, MFW28, MFW31) не было обнаружено специфических ампликонов, частота встречаемости которых позволяла бы использовать их для паспортизации.

Таким образом, данные микросателлитные маркеры дают некоторую информацию о генетическом разнообразии пород карпа белорусской селекции и межпородных различиях, но оказываются малоэффективными для целей паспортизации.

Работа выполнена в рамках задания 37 «Оценить генетическое разнообразие и создать экологогенетические и молекулярно-биологические паспорта карпа белорусской селекции» подпрограммы «Сельскохозяйственная биотехнология (животноводство)» государственной программы «Инновационные биотехнологии».

Таблица 4

чешуйчатой, тремлянской зеркальной, тремлянской чешуйчатой, изобелинской смесь зеркальной, изобелинской смесь чешуйчатой, Сравнение спектров и частот ампликонов по праймеру к микросателлитному локусу МҒW-7 лахвинской зеркальной, лахвинской изобелинской «Триприм» и изобелинской «Столин XVIII» отводок карпа

в выборке по локусу, %	Изобелинский «СТолин XVIII»	16															60,6		72,73	27,27						60,6		
	йияэницэдоеМ «мицпидТ»	15				13,34	26,67				6,67							13,34	60,00			13,34	13,34	13,34	46,67	20,00		
	Мзобелинский йілткРйушэР	14	3,34	3,34	3,34	13,34		6,67					20,00	3,34	3,34		30,00		33,34	20,00	3,34	10,00		10,00	40,00			
	Изобелинский зеркальный	13				50,00		16,67											66,67						83,34			16,67
98	йияэнгимэдТ йічткчйушэч пдвя	12					20,00			6,67	6,67					6,67		13,34	40,00	13,34		6,67		6,67	13,34	26,67		
Процент ампликонов	Тремлянский зеркальный	11					20,00		30,00			30,00							30,00	50,00						40,00	30,00	
пофП	Лахвинский чешуйчатый карп	10					11,12					11,12							22,24	55,56			11,12	11,12		11,12	33,34	
	Лахвинский зеркальный	6																30,00					10,00	30,00		30,00		
	Мзобелинский «Столин XVIII» карп	~															286		265±0,69	253±1,05						194		
	Изобелинский «Триприм» карп	7				556±6,62	536±3,43				436							278±1,64	263±0,92			236	226	218	205±1,16	197±1,57		
снований Процент ампликон	Изобелинский смесь чешуйчатыая карп	9	*499	*609	581*	548±4,23		526±5,82					345±2,13*	321*	304*		284±1,16		267±0,89	258±1,10	245	234±0,97		216±0,77	203±1,12			
, 0	Изобелинский смесь зеркальная карп	5				552±2,94		527											263±1,50						205±1,35			176*
Ампликоны, пар с	Тремлянский йілтагийчэг павы	4					534±0,65			*805	433					292*		277±0,75	263±0,97	253±0,36		233		219	$206\pm0,36$	196±1,95		
AMIL	Тремлянский зеркальный павл	3					535±1,01		517±1,65*			400±2,46							266±0,61	253±0,79						196±1,04	186±1,43	
	Лахвинский чешуйчатый карп	2					539					400							266±0,80	254±0,94			228	212		199	188±1,09	
	Лахвинский зеркальный карп	-																276±1,44	*				224	216±0,40		194±1,95		
	тип ампликона		-	7	т	4	5	9	7	∞	6	10	Ξ	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26

* – специфический ПЦР-фрагмент; ** – отсутствие ПЦР-фрагмента, имеющегося у всех других пород и отводок

Таблица 5

Сравнение спектров и частот ампликонов по праймеру МFW28 лахвинской зеркальной, лахвинской чешуйчатой, тремлянской зеркальной, тремлянской чешуйчатой, изобелинской смесь зеркальной, изобелинской смесь чешуйчатой, изобелинской «Триприм» и изобелинской «Столин XVIII» отводок карпа

14,29 57,14 28,57 14,29 «Столин XVIII» 85,71 16 Изобелинский 36,36 45,45 54,55 45,45 «мидпидТ» 60.6 15 Изобелинский Процент ампликонов в выборке по локусу, чешуйчатый 14 40 99 28 36 4 4 Изобелинский 16,67 зеркальный 66,67 16,67 Изобелинский карп 15,38 23,07 38,46 46,15 30,77 7,69 7,69 2 йыткийүшэн Тремлянский зеркальный 37,5 37,5 62,5 Тремлянский карп 10 8 | 2 10 чешуйчатый 40 9 40 Лахвинский 22,22 44,45 33,33 22,22 зеркальный Лахвинский карп 310 ± 3.60 292** «Столин XVIII» Изобелинский 296±2,90** $181\pm1,47$ $\overline{310}$ ±1,41 «Триприм» карп 319 190 Изобелинский карп 291±0,97** 181 ± 0.80 $301\pm1,02$ 175±0,70 187 ± 0.53 **кы**нтариушэр 197 9 сиеср Изобелинский Ампликоны, пар оснований ,84** зеркальная карп 316 смесь 311 296±1 Изобелинский 295±1,90** карп $180\pm 2,0$ 315 304 **мыткрйушэр** 4 Тремлянский 83±0,90 карп 292** зеркальный \mathcal{C} 31 Тремлянский 295±3,04** $282\pm1,60*$ 263±2,20* 238±1,82* карп $184 \pm 1,26$ 315 ± 0.39 $307 \pm 2,06$ 178±0,75 90 чешуйчатый Лахвинский 297±2,05** кчрп 317 ± 0.89 305 ± 1.53 187 ± 1.37 зеркальный Лахвинский 10 Ξ 12 13 S 9 ∞ Тип ампликона 2 m 6

* – специфический ПЦР-фрагмент; ** – ПЦР-фрагмент присутствует во всех отводках.

Таблица 6

Сравнение спектров и частот ампликонов по праймеру МҒW31 лахвинской зеркальной, лахвинской чешуйчатой, тремлянской зеркальной, тремлянской чешуйчатой, изобелинской смесь зеркальной, изобелинской смесь чешуйчатой, изобелинской «Триприм» и изобелинской «Столин XVIII» отводок карпа

	изобелинский «Столин XVIII»	16			42,86		28,57		7,14	14,28	
ycy, %	изобелинский «Триприм»	15		26,67	13,33			46,67		53,33	
ке по лок	изобелинский йілтярийнэг	14		26,67	20	30	10	30	20	16,67	20
в выбор	изобелинский зеркальный	13			29,99				16,67	83,33	
Процент ампликонов в выборке по локусу,	тремлянский чешуйчатый карп	12		28,57	42,86		14,28			14,28	
энт амп	тремлянский йіднапкэдэг	11	40	50	10			40	10		
Проце	лахвинский чешуйчатый карп	10	40			40		30	10		
	лахвинский зеркальный	6		40		40		20	10		
	йимэнигьдоги «ШУХ ниготЭ» паври	8			297±2,38		279±2,15		259	250±4,00	
	изобелинский «Триприм» карп	7		$308\pm1,68$	291±2,05			260±1,53		247±1,33	
,E	изобелинский смесь чешуйчатыая пдая	9		310±1,37	296±0,82	287±1,00	278±2,36	268±1,07	251±0,60	241±1,38	231±1,20
пр оснований	Изобелинский смесь зеркальная карп	5			296±2,85				255	248±2,03	
Ампликоны, па	тремлянский йнтвгийч пдвя	4		307±1,07	294±1,38		277±1,07			245±2,70	
AM	тремлянский йіднапачарає пдвя	3	321±0,36	304±1,94	293			266±0,42	252		
	пахвинский чешуйчатый пдвя	2	320±3,03			274±1,61		265±1,60	258		
	лахвинский зеркальный карп	1		304±1,28		276±1,21		264±2,01	254		
	Тип ампликона	-	2	Э	4	5	9	7	∞	6	

Таблица 7

чешуйчатой, тремлянской зеркальной, тремлянской чешуйчатой, изобелинской смесь зеркальная, изобелинской смесь чешуйчатая, Сравнение спектров и частот ампликонов по праймеру к микросателлитному локусу МFW-16 лахвинской зеркальной, лахвинской изобелинской «Триприм» и изобелинской «Столин XVIII» пород и отводок карпа

Процент ампликонов в выборке по локусу, %	Изобелинский «Столин XVIII»	16							36,36					36,36	36,36		36,36	36,36		
	Изобелинский «миqпиqТ»	15	6,67		6,67	6,67			20,00	6,67		6,67			40,00		29,99	6,67	20,00	
	Изобелинский йыткүйчэг	14				13,64	13,64		13,64			13,64	13,64		54,55	4,55	31,82	31,82	18,18	
	Изобелинский зеркальный	13													29,99	16,67	16,67	83,33		
	Тремлянский йыткгүйчэг пдвя	12		6,67		6,67	6,67	13,33	13,33		6,67		6,67		26,67	33,33		73,33	6,67	29.9
	Тремлянский зеркальный	11			10,00									10,00	10,00		30,00	00,09		10,00
	Лахвинский чешуйчатый карп	10						10,00						10,00	50,00	20,00	40,00	30,00		
	Лахвинский зеркальный	6												10,00		20,00	30,00	00,09		20,00
	Изобелинский «Столин XVIII» карп	8							369±1,26					$185\pm1,14$	176±0,82		140±0,67	135±1,28**		
	Изобелинский «Триприм» карп	7	778*		576	532			369±2,09	342*		306			173±0,68		142±0,85	137**	120±0,88	
\	Изобелинский смесь чешуйчатыая карп	9				535±5,59	493±6,63		363±3,28			306±1,97	268±2,95		170±1,21	165	143±1,00	135±0,94**	121±0,98	
р оснований	Изобелинский смесь зеркальная карп	5													167±1,88	156	142	134±1,47**		
Ампликоны, пар	Тремлянский йнтврйчшэр пдвя	4		651*		518	508	378±7,20	365±3,44		326*		281		171±0,88	156±1,54		131±0,48**	125	114
	Тремлянский зеркальный карп	3			563									180	173		142±1,35	134±1,40**		115
	Лахвинский чешуйчатый карп	2						395						188	167±2,01	151±0,45	141±1,59	135±0,90**		
	Лахвинский зеркальный карп	1												180	* * *	154±0,50	141±1,93	134±0,67** 135±0,90**		116±0,32
	Тип ампликона		-	2	ε	4	5	9	7	∞	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18

* – специфический ПЦР-фрагмент; ** – ПЦР-фрагмент присутствует во всех отводках; *** – отсутствие ПЦР-фрагмента, имеющегося у всех других пород и отводок.

Молекулярная и прикладная генетика. Том 13, 2012 г.

Список использованных источников

- 1. Сулимова, Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г.Е. Сулимова // Электронный журнал лаборатории сравнительной генетики животных ИО Ген им. Н.И. Вавилова РАН [Электрон. ресурс]. 2004. Режим доступа: http://lab-cga.ru/articles/jornal01/statia1.htm. Дата доступа: 17.11.2011.
- 2. Календарь, Р.Н. Типы молекулярногенетических маркеров и их применение / Р.Н. Календарь, В.И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. — 2002. — Т. 34, №4. — С. 279—295.
- 3. NCBI Resources. Genes & Expression. Gene [Электрон. pecypc] / The National Center for Biotechnology Information. Режим доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Cyprinus+carpio. Дата доступа: 16.11.2011.
- 4. Genetic analysis of two carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. / R. Bartfai [et al.]//Aquaculture. 2003. Vol. 219. P. 157–167.
- 5. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay / H. Barman [et al.] // Aquaculture. 2003. Vol. 217. P. 115–123.
- 6. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers / J. Zhou [et al.] // Rus. J. Genetics. 2004. Vol. 40. №10. P. 1144–1148.
- 7. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitohondrial DNA

- markers / K. Kohlmann [et al.] // Aquat. Living Resour. 2003. Vol. 16. P. 421–431.
- 8. Chistiakov, D.A. Genetic evolution and diversity of common carp *Cyprinus carpio* L. / D.A. Chistiakov, N.V. Voronova // Cent. Eur.J.Biol. 2009. Vol 4, №3. P. 304–312.
- 9. Генетическое разнообразие и дифференциация отечественных пород карпа (*Cyprinus carpio* L.), выявляемая с помощью RAPD-маркеров. / Р.И. Луданный [и др.] // Генетика. 2006. Т. 42, №8. С. 1121–1129.
- 10. Конева, О.Ю. Молекулярно-генетическая паспортизация лахвинской и тремлянской породных групп карпа (*Cyprinus carpio* L.) методом RAPD-анализа / О.Ю. Конева, С.Е. Дромашко // Весці НАН Беларусі, сер. аграр. навук. 2011. №1. С. 81–88.
- 11. Слуквин, А.М. Генетическая идентификация стерляди (*Acipenser ruthenus* L.), выращенной в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области по микросателлитным маркерам / А.М. Слуквин, О.Ю. Конева, М.И. Лесюк // Молекулярная и прикладная генетика. 2009. Т.9. С. 146—152.
- 12. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) / Н.Н. Тимошкина [и др.] // Генетика. 2009. Т. 45, №9. С. 1250—1259.
- 13. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) / R.P.M.A. Crooijmans [et al.] // Animal Genetics. 1997. №28. P. 129–134.
- 14. Polymorphism of microsatellite markers in Russian common carp (*Cyprinus carpio* L.) breeds / R.I. Ludanny [et al.] // Rus. J. Genetics. 2010. Vol. 46, №5. P. 572–577.

Дата поступления статьи 23 ноября 2011 г.

Н.В. Савина, Т.Д. Кужир

ПАРАМЕТРЫ НОРМАЛЬНОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТОВ НА ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК: РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Техногенное загрязнение окружающей среды ускоряет мутационный процесс и приводит к накоплению мутационного груза в популяциях. Предполагается, что мутации, влияющие на функционирование генов, ответственных за репарацию ДНК, сигнальную трансдукцию и клеточный ответ на генотоксический стресс, повышают чувствительность данного индивидуума и его потомства к неблагоприятным факторам и способствуют развитию геномной нестабильности. Этот феномен интенсивно изучается в связи с загрязнением среды мутагенами физической и химической природы [1-6].

Геномная нестабильность характеризуется повышенным фоновым уровнем генетических повреждений, снижением порога чувствительности к мутагенам и задержанными эффектами, которые проявляются в виде разнообразных генетических нарушений в соматических и половых клетках *in vitro* и *in vivo* в отдаленные сроки после мутагенного воздействия. Дестабилизация генома может вызывать злокачественную трансформацию клеток, передаваться в ряду поколений, как на клеточном, так и организменном уровне, влиять на состояние здоровья [7-9]. Имеющиеся данные, обобщенные в [10], указывают на серьезные последствия развития геномной нестабильности, которые определяют актуальность выявления этого феномена у населения.

Кроме того, существует группа заболеваний, предполагающих наличие у больных наследственно обусловленной геномной нестабильности (например, анемия Фанкони, синдромы Луи-Бар, Ниймеген и др.). Несмотря на различия в клинической картине, перечисленные заболевания имеют ряд общих особенностей, главная из которых — синдром хромосомной нестабильности (СХН) [11], в связи с чем оценка целостности генома является одним из важнейших диагностических приемов, способствующих ранней диагностике этих синдромов и обнаружению гетерозиготного носительства соответствующих мутаций. Не менее важно

выявление групп генетического риска или отдельных индивидуумов с признаками геномной нестабильности среди населения, подвергающегося мутагенному воздействию факторов окружающей и производственной среды.

Для указанных целей нами предложена технология диагностики геномной нестабильности в лимфоцитах периферической крови, основанная на применении метода ДНК-комет. Она включает следующие процедуры: а) выделение лимфоцитов; б) проверку их жизнеспособности; в) определение фонового уровня повреждений ДНК; г) проверку чувствительности лимфоцитов к окислительному стрессу; д) определение кинетики и эффективности репарации ДНК в течение 3-часовой инкубации клеток после мутагенного воздействия. Технология апробирована в группах пациентов с предполагаемым диагнозом СХН и множественными врожденными пороками развития (МВПР), у потенциальных гетерозиготных носителей мутаций, ответственных за СХН, у работников ОАО «Минский автомобильный завод», профессионально контактирующих с вредными факторами среды. Проведенные исследования и опубликованные результаты [12-16] свидетельствуют об эффективности данной технологии и целесообразности ее внедрения в практику. Однако при исследовании образцов крови от отдельного индивидуума, чтобы сделать вывод о наличии или отсутствии геномной нестабильности, необходимы критерии нормы изучаемых показателей. В медицинской практике наиболее целесообразно использовать непараметрические критерии, которые не зависят от характера распределения и приемлемы для оценки любых медико-биологических признаков [17, 18]. В данной статье представлены результаты определения референтных (нормальных) интервалов для показателей, характеризующих стабильное состояние генома, а также приведены примеры индивидуального анализа целостности генома у представителей различных групп риска.

Материалы и методы

Образцы периферической венозной крови получены от доноров-добровольцев после подписания ими информированного согласия и заполнения анкеты участника исследования, которая содержит сведения о возрасте, адресе проживания, месте и стаже работы, условиях труда, вредных привычках, перенесенных заболеваниях, приеме лекарств, рентгенологическом обследовании и некоторые другие. Конфиденциальность этой информации гарантируется. Забор крови производился квалифицированным медперсоналом ГУ РНПЦ «Мать и дитя», ГУ РНПЦ гематологии и трансфузиологии и медико-санитарной части ОАО «МАЗ».

Обследованная контрольная выборка жителей Беларуси (172 человека) включала лица от 23 до 60 лет (средний возраст $44,05 \pm 0,87$); среди них 94 мужчины и 78 женщин, не имеющие хронических заболеваний, курящие (50) / некурящие (122).

Образцы цельной крови в количестве 5 мл отбирали в стерильные вакаутайнеры с гепарином и хранили в холодильнике при 4 °C не более 2-3-х часов. *Объект исследования* изолированные лимфоциты. Фракцию лимфоцитов выделяли из цельной крови центрифугированием в градиенте Histopaque-1077 (ICN) в течение 30 минут. Затем лимфоциты отмывали и инкубировали при 37 °C в среде RPMI-1640 с добавлением инактивированной телячьей сыворотки (10%) в течение 3-х часов. В качестве модельного мутагена, индуцирующего окислительный стресс, использовали пероксид водорода (H₂O₂) в концентрации 100 мкМ, которую получали разведением 3% раствора H₂O₂ в PBS, (рН 7,4). Обработку клеток проводили при температуре 4 °C, в течение 1 минуты, после чего клетки отмывали от мутагена охлажденным буферным раствором.

Выживаемость лимфоцитов определяли методом прижизненной окраски клеток трипановым синим. Анализ проводили под микро-

скопом с использованием камеры Бюркера, при этом учитывали соотношение мертвых (округлые клетки голубого цвета без видимого повреждения мембраны) и живых клеток.

Для выявления *повреждений ДНК* использовали метод щелочного гель-электрофореза единичных клеток (метод ДНК-комет, щелочная версия) [19, 20], который включал следующие этапы: 1) приготовление микропрепаратов в агарозном геле, 2) лизис клеток для высвобождения ДНК; 3) щелочная денатурация при рН>13; 4) горизонтальный электрофорез, вызывающий миграцию фрагментов ДНК в электрическом поле с образованием «кометы»; 5) нейтрализация препаратов; 6) окрашивание препаратов бромистым этидием и их анализ с помощью флуоресцентного микроскопа.

Для изучения *репарации ДНК* проводили отбор проб на 0, 30, 60, и 180-й минуте после обработки лимфоцитов пероксидом водорода. *Эффективность репарации ДНК* рассчитывали по проценту элиминированных повреждений ДНК в каждой точке анализа относительно 0-й точки. Все процедуры, условия их проведения, параметры визуальной оценки степени повреждения ДНК и эффективности репарации ДНК подробно описаны ранее [16].

Статистический анализ полученных данных проводили с применением стандартных средств Microsoft Office (Excel-2000) и программы Statistica. В качестве количественных показателей использованы значения медиан; референтные интервалы определяли путем вычисления 10-го и 90 процентилей [18] для выявления лиц с повышенной чувствительностью лимфоцитов к ДНК-повреждениям или пониженной эффективностью репарационных процессов. Кинетика репарации ДНК описывается уравнением степенной зависимости; в системе логарифмических координат сравниваются коэффициенты линейной регрессии по критерию t Стьюдента [16].

Результаты и обсуждение

При изучении состояния генома у волонтеров из контрольной группы [10] были выявлены лица, у которых клеточный ответ на повреждения ДНК существенно отличался от среднегрупповых значений. Это же наблюда-

лось в большой выборке работников автомобильной промышленности [13], в комплексе подтверждая существование индивидуальной чувствительности к генотоксическим факторам среды, и одновременно свидетельствуя о случаях геномной нестабильности, возникающих независимо от внешних воздействий. Следовательно, мониторинг групп риска актуален не только для обнаружения геномной нестабильности как общего феномена, характеризующего данную группу людей, но и для выявления отдельных индивидуумов с признаками геномной нестабильности. Поскольку из литературы известно о вкладе геномной нестабильности в развитие патологических состояний и заболеваемость населения, выявление таких индивидуумов могло бы способствовать персонализации медицинской и профилактической помощи.

Важным этапом любых медико-биологических исследований является определение нормальных величин изучаемых показателей, ассоциированных с оптимальным здоровьем и

минимальным риском. Для этого выбран непараметрический процентильный метод, который не ограничен характером распределения признаков [17, 18]. Следует подчеркнуть, что при использовании этого метода для установления референтного (нормального) интервала необходимо соблюдение строгих требований, и прежде всего, размер выборки должен быть не менее 120 человек. Нами проанализированы данные по выборке из 172 клинически здоровых жителей Беларуси. В качестве верхних и нижних границ референтного интервала, соответствующего норме, рассчитаны 10-й и 90-й процентили. Зоны ниже 10-го и выше 90-го процентиля указывают на выраженное снижение или повышение изучаемого показателя [18]. Результаты определения референтного интервала для параметров стабильного генома представлены в табл. 1.

Таблица 1 Количественная характеристика основных параметров, характеризующих стабильное состояние генома (n=172)

Парамотр анамия	Значения в точках фиксации клеток					
Параметр оценки	0 мин	30 мин	60 мин	180 мин		
Фоновый уровень повреждений				71		
ДНК, а.и.	_	_	_	$2-15^2$		
Индуцированный уровень	75¹	211	171	11 ¹		
повреждений ДНК, а.и.	52-110 ²	10–472	7–322	4–252		
Эффективность процессов репарации		701	771	851		
окислительных повреждений ДНК, %	_	48-842	$60-89^2$	70–942		

В таблице представлены значения медианы $(Me)^1$ и интервалы нормы для каждого показателя (80%-й интерпроцентильный размах между 10-м и 90-м процентилями) 2

Вторым важным этапом обнаружения геномной нестабильности является формирование групп риска. На основании наших и литературных данных можно заключить, что существенный риск возникновения геномной нестабильности характерен для населения, проживающего в экологически неблагоприятных районах, либо по роду своей профессиональной деятельности контактирующего с мутагенными факторами среды; пациентов с заболеваниями, которые вызваны или сопровождаются понижением активности репарационных процессов, а также ассоциированы со старением и накоплением повреждений ДНК.

Для проверки чувствительности лимфоцитов к влиянию окружающей среды в группах риска, контактирующих с мутагенными факторами,

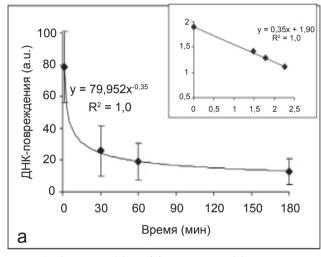
или для определения целостности генома у пациентов с заболеваниями, обусловленными нарушениями репарации ДНК и других защитных (антиоксидантных/антимутагенных) систем, имеет значение оценка фонового/эндогенного уровня повреждений ДНК. Величины выше 15 а.и. свидетельствуют о повышенном фоновом/эндогенном уровне повреждений ДНК.

Для проверки чувствительности лимфоцитов к дополнительному мутагенному воздействию (в частности, к окислительному стрессу) наиболее важной является оценка начального уровня индуцированных повреждений ДНК, зарегистрированного сразу после воздействия мутагена. Величины выше 110 а.и. указывают на повышенную чувствительность клеток к дополнительному мутагенному воздействию.

Уровни остаточных окислительных повреждений, превосходящие 25 а.и., могут свидетельствовать о повышенной чувствительности лимфоцитов к окислительному стрессу, а в случае существенного превышения фонового уровня, они указывают на задержку репарации ДНК.

Кинетика репарации окислительных повреждений ДНК аппроксимирована уравнением степенной функции (рис. 1a). Отметим,

что о скорости репарации дает представление коэффициент линейной регрессии (-0,35), который в данном случае характеризует «нормальную» скорость этого процесса. Однако на практике для быстроты анализа достаточно вычислить эффективность репарации ДНК (рис. 1б), особенно на 180 мин инкубации лимфоцитов: величина ниже 70% свидетельствует не только о понижении эффективности, но и о замедлении репарации ДНК.



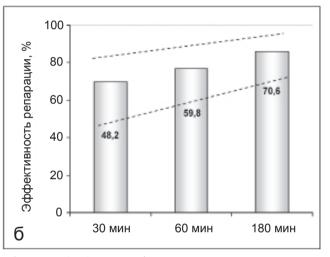


Рис. 1. Кинетика (а) и эффективность (б) репарации ДНК после обработки лимфоцитов пероксидом водорода

Слева (а) представлены фактические данные как средние \pm стандартные отклонения, аппроксимированные уравнением степенной функции; на вставке — те же данные в LOG-координатах. Справа (б) пунктирными линиями отмечены 10-й 90-й процентили, ограничивающие референтные интервалы, которые соответствуют норме.

Изменения перечисленных показателей у обследованных лиц, выходящие за пределы установленных «интервалов нормы», следует рассматривать как *признаки геномной неста- бильности*.

С помощью предложенной технологии установлена геномная нестабильность в группах пациентов с СХН и гетерозиготных носителей соответствующих мутаций [14, 15]; детей с МВПР, в частности, с синдромами микроделеций [12, 16]. Кроме того, выявлены отдельные случаи дестабилизации генома в группе работников автомобильной промышленности [13].

Далее приведены примеры использования предложенной технологии для индивидуальной оценки состояния генома в лимфоцитах периферической крови.

1. Обследуемый А, представитель группы пациентов с предполагаемым диагнозом «синдром хромосомной нестабильности» (СХН).

Совокупность определенных клинических признаков и данные выполненного сотрудниками РНПЦ «Мать и дитя» цитогенетического анализа позволили установить у этого пациента анемию Фанкони. Дополнительно образцы крови проанализированы с помощью разработанной технологии. В лимфоцитах пациента определены уровни: 1) эндогенных повреждений ДНК; 2) повреждений, индуцированных пероксидом водорода; 3) кинетика и эффективность репарации ДНК за период 3-часовой инкубации обработанных лимфоцитов при 37 °С. Результаты для удобства объединены в табл. 2 с данными следующего пациента, кинетика репарации ДНК представлена на рис. 2а.

Заключение. У данного пациента обнаружены следующие *признаки геномной нестабильности*: уровень эндогенных повреждений в 3,5 раза превышает этот показатель в референтной выборке здорового населения Беларуси и

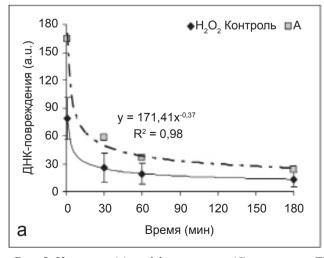
выходит за пределы интервала нормы. Частота индуцированных повреждений ДНК на 0, 30, 60-й минутах после мутагенного воздействия выше, чем у здоровых лиц, и также превосходит верхнюю границу референтных интервалов.

Показатели ЭР в пределах нормы. Проведенное исследование показывает, что данный пациент отличается высокой чувствительностью клеток к окислительному стрессу, что свойственно для анемии Фанкони.

Таблица 2 Результаты анализа целостности генома в лимфоцитах периферической крови у пациентов A и Б в сравнении с показателями нормы

Попомотр опомии	Значения в точках фиксации клеток					
Параметр оценки	0 мин	30 мин	60 мин	180 мин		
Обследуемый А	_	_	_	26		
Обследуемый Б	_	_	_	35		
Фоновый уровень повреждений				71		
ДНК, а.и.	_	_	_	$2-15^2$		
Обследуемый А	164	58	36	24		
Обследуемый Б	107	72	58	31		
Индуцированный уровень	75¹	211	171	11 ¹		
повреждений ДНК, а.и.	$52-110^2$	10–472	$7-32^{2}$	4-252		
Обследуемый А	_	65	78	85		
Обследуемый Б	_	33	46	71		
Эффективность процессов репарации		701	77¹	851		
окислительных повреждений ДНК (ЭР), %	_	48–84 ²	60–89 ²	70–94 ²		

2. Обследуемый Б, представитель группы пациентов с предполагаемым диагнозом микроделеций. С помощью FISH-метода обнаружена микроделеция 7q11.23, подтверждающая диагноз «синдром Вильямса». В лимфоцитах пациента определены уровни: 1) эндогенных повреждений ДНК; 2) повреждений, индуцированных пероксидом водорода; 3) кинетика и эффективность репарации ДНК за период 3-часовой инкубации обработанных лимфоцитов при 37 °С (табл. 2, рис. 2б).



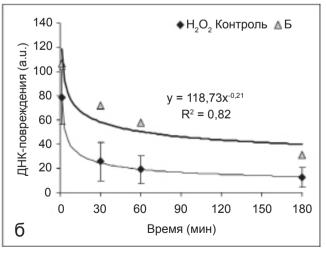


Рис. 2. Кинетика (а) и эффективность (б) репарации ДНК после обработки лимфоцитов пероксидом водорода

<u>Заключение</u>. У данного пациента обнаружены следующие признаки геномной нестабильности: уровень эндогенных повреждений

в 5 раз превышает этот показатель в выборке здорового населения Беларуси и выходит за пределы референтного интервала. Частота ин-

дуцированных повреждений ДНК на 30, 60 и 180-й минутах после мутагенного воздействия превышает соответствующие интервалы нормы. Кинетика репарации ДНК свидетельствует о замедлении этого процесса. Показатели ЭР во всех точках меньше, чем у здорового населения, а в течение первого часа исследования выходят за нижние границы интервала нормы. Проведенное исследование показывает, что данный пациент отличается повышенной чувствительностью клеток к дополнительному мутагенному воздействию за счет снижения скорости и эффективности репарации ДНК, что может быть обусловлено утратой ассоциированных с микроделецией генов, контролиру-

ющих клеточный ответ на повреждения ДНК.

3. Обследуемый В, представитель группы лиц, занятых на производстве, возраст 59 лет; 38 лет стажа; не курит; не имеет непосредственного контакта с мутагенными факторами. Забор периферической крови произведен после получения информированного согласия.

В ходе исследования образцов крови определены: 1) спонтанная и индуцированная гибель лимфоцитов; 2) уровень фоновых и 3) индуцированных повреждений ДНК; 4) эффективность процесса репарации окислительных повреждений ДНК за период 3-х часовой инкубации клеток. Результаты исследования представлены в табл. 3.

Таблица 3 Результаты анализа целостности генома в лимфоцитах периферической крови у пациентов В и Г в сравнении с показателями нормы

П	Значения в точках фиксации клеток					
Параметр оценки	0 мин	30 мин	60 мин	180 мин		
Обследуемый В	_	_	_	7		
Обследуемый Г	_	_	_	3		
Фоновый уровень повреждений				71		
ДНК, а.и.	_	_	_	2-152		
Обследуемый В	84	29	10	8		
Обследуемый Г	129	86	53	4		
Индуцированный уровень	75¹	211	171	11 ¹		
повреждений ДНК, а.и.	$52-110^2$	10-472	7–322	4-252		
Обследуемый В	_	65	88	90		
Обследуемый Г	_	33	59	97		
Эффективность процессов репарации		701	771	051		
окислительных повреждений	_	70^{1} $48-84^{2}$	60-892	85 ¹ 70–94 ²		
ДНК (ЭР), %		40-04	00-89	/0-94		

Заключение. Все полученные количественные показатели у донора В не выходят за пределы интервалов нормы, свойственных здоровым представителям населения Беларуси, и характеризуют состояние его генома как стабильное.

4. Обследуемый Г, представитель группы лиц, занятых на производстве, возраст 43 года; 20 лет стажа; не курит; вредные факторы производственной деятельности — шум, вибрация. Забор периферической крови произведен после получения информированного согласия.

В ходе исследования образцов крови определены: 1) спонтанная и индуцированная гибель лимфоцитов; 2) уровень фоновых и

3) индуцированных повреждений ДНК; 4) эффективность процесса репарации окислительных повреждений ДНК за период 3-х часовой инкубации клеток. Результаты исследования представлены в табл. 3.

Заключение. У донора Г обнаружены следующие *признаки геномной нестабильности*: частота индуцированных повреждений ДНК на 0, 30, 60-й минутах после мутагенного воздействия больше, чем у здоровых лиц, и превышает соответствующие интервалы нормы. Показатели ЭР на 30 и 60-й мин анализа ниже, чем в референтной выборке, и выходят за пределы нормы. Результаты анализа показывают, что ответ лимфоцитов на дополнительное

мутагенное воздействие увеличен, в том числе и за счет задержки репарации ДНК в течение первого часа инкубации клеток, затем все показатели приходят к норме.

Приведенные примеры демонстрируют эффективность предложенной технологии в выявлении признаков геномной нестабильности. В случае подозрения на СХН или синдромы микроделеций она служит хорошим дополнением к принятым методам цитогенетического обсле-

дования пациентов, при этом обладает большей информативностью, так как дает возможность комплексно оценить уровень эндогенных повреждений ДНК, чувствительность генома к дополнительному мутагенному воздействию и репарацию ДНК. Результаты, полученные с помощью этой технологии, косвенно указывают на механизмы геномной нестабильности. В практическом плане они могут быть использованы для персонализации медицинской помощи.

Заключение

Геномная нестабильность формируется в результате влияния неблагоприятных факторов окружающей среды, а также может быть генетически обусловлена нарушениями процесса репарации ДНК или других защитных реакций клеток и организма. Геномная нестабильность приводит к канцерогенезу и развитию соматических заболеваний. Такие признаки геномной нестабильности, как аномальный ответ клеток на эндогенные и экзогенные повреждения ДНК, являются чувствительными биомаркерами патологических состояний.

В соответствии с разработанной технологией диагностики геномной нестабильности предлагается с помощью метода ДНК-комет учитывать следующие показатели: 1) уровень эндогенных (фоновых) повреждений ДНК; 2) чувствительность лимфоцитов к дополнительному мутагенному воздействию (окислительному стрессу); 3) кинетику выхода индуцированных повреждений ДНК в течение 3-часовой инкубации клеток после мутагенной обработки; 4) эффективность репарации ДНК за этот же период. Показатели,

полученные у обследуемых лиц, сравниваются с аналогичными показателями, полученными на большой выборке здорового населения. Используя принятый в медицинских исследованиях статистический подход, рассчитаны референтные интервалы для каждого признака, ограниченные 10-м и 90-м процентилями. Величины, превышающие 90-й процентиль для уровней эндогенных и индуцированных повреждений ДНК, свидетельствуют о повышенной чувствительности генома к повреждениям ДНК, тогда как значения ниже 10-го процентиля для показателей эффективности репарации ДНК указывают на недостаточную эффективность и скорость этого процесса.

Следует подчеркнуть, что обнаружение индивидуальных отличий от референтных величин, свидетельствующих о признаках геномной нестабильности, имеет большое прогностическое значение для обследуемого лица, так как может отражать наличие патологических процессов и использоваться при разработке индивидуальных программ профилактики и коррекции лечения.

Список использованных источников

- 1. Dose and time-response relationships for lethal mutations and chromosomal instability induced by ionizing radiation in an immortalized human keratinocyte cell line / C. Mothersill [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. 2000. Vol. 7. P. 799–806.
- 2. Transgenerational mutation by radiation / Y.E. Dubrova [et al.] // Nature. 2000. Vol. 405. P. 37.
- 3. Воробцова, И.Е. Трансгенерационная передача радиационно-индуцированной нестабильности генома / И.Е. Воробцова //

- Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46, №4. С. 441—446.
- 4. Nomura, T. Transgenerational effects of radiation and chemicals in mice and humans / T. Nomura // J. Radiat. Res. (Tokyo). 2006. Vol. 47, Suppl. B. P. B83–B97.
- 5. Ингель, Ф.И. Качество жизни и индивидуальная чувствительность генома человека. Есть ли выход из порочного круга? / Ф.И. Ингель // Экологическая генетика. 2005. Ч. III. С. 38-45.
 - 6. Ryabokon, N.I. Transgenerational ac-

- cumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout / N.I. Ryabokon, R.I. Goncharova // Radiat. Environ. Biophys. 2006. Vol. 45. P.167–177.
- 7. Копнин, Б.П. Нестабильность генома и онкогенез / Б.П. Копнин // Молекулярная биология. 2007. Т. 41, №2. С. 369–380.
- 8. Проблема индуцированной геномной нестабильности как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах / И.И. Сусков [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46, №2. С. 167—177.
- 9. Aghajanyan, A. Transgenerational genomic instability in children of irradiated parents as a result of the Chernobyl Nuclear Accident / A. Aghajanyan, I. Suskov // Mutat. Res. 2009. Vol. 671. P.52–57.
- 10. Индуцированная геномная нестабильность как фактор заболеваемости. Оценка целостности генома человека методом ДНК-комет / Р.И. Гончарова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. Минск, 2008. Т. 7. С.86—93.
- 11. Taylor, A.M. Chromosome instability syndromes / A.M. Taylor // Best Pract. Clin. Haemotol. 2001. Vol. 14, No. 3. P.631–644.
- 12. Оценка статуса генома методами цитогенетического анализа и ДНК-комет у пациентов с множественными врожденными пороками развития / Н.В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. Минск, 2009. Т. 9. С. 127–133.
- 13. Метод ДНК-комет в выявлении геномной нестабильности. Мониторинг состояния генома у работников ОАО «МАЗ»

- / Н.В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. Минск, 2009. Т. 10. С. 108–113.
- 14. Оценка состояния генома у потенциальных носителей мутаций, ответственных за синдромы хромосомной нестабильности / Н.В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. Минск, 2010. Т. 11. С. 34—44.
- 15. Estimation of genome instability by the comet assay in different risk groups / M.P. Smal [et al.] // Rapid Diagnosis in Populations at Risk from Radiatial and Chemicals: NATO Science for Peace and Security. Series E: Human and Societal Dynamics (Eds. A. Cebulska-Wasilewska, A. Osipov, F. Darroudi). IOS Press, 2010. Vol. 73 P. 201–210.
- 16. Chromosomal instability at the 7q11.23 region impacts on DNA-damage response in lymphocytes from Williams-Beuren syndrome patients / N.V. Savina [et al.] // Mutat. Res. 2011. Vol. 724. P. 46–51.
- 17. Bland, M. An Introduction to Medical Statistics. Third Edition / M. Bland. Oxford: Oxford University Press, 2000. 410 p.
- 18. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. М.: Медиа Сфера, 2002. 312 с
- 19. Single cell gel / Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing / R.R Tice [et al.] // Environ. Mol. Mutagen. 2000. Vol. 35. P. 206–221.
- 20. Collins, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations / A.R. Collins // Mol. Biothechnology 2004. Vol. 26. P. 249–261.

Дата поступления статьи 28 ноября 2011 г.

УДК 635.21: 631.539: 631.527.3: 631.524.86: 577.21

В.И. Лукша, Е.В. Воронкова, О.Н. Гукасян, А.П. Ермишин

ОЦЕНКА ПЕРВИЧНЫХ ДИГАПЛОИДОВ S. TUBEROSUM НА НАЛИЧИЕ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ И ВРЕДИТЕЛЯМ МЕТОДОМ ПЦР-АНАЛИЗА

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Потери урожая картофеля, вызванные вирусными, бактериальными и грибными заболеваниями, могут достигать 40 и более процентов в процессе вегетации и 20-30% при хранении клубней [1]. Это связано, с одной стороны, с высокой адаптивной способностью многих возбудителей болезней и вредителей и, с другой стороны, недостаточной устойчивостью к ним существующих сортов картофеля.

Селекция сортов картофеля с комплексной устойчивостью к болезням и вредителям сильно затруднена из-за специфических биологических особенностей культуры. Новые сорта выводят путем гибридизации тетраплоидных гетерозигот. Как и у других полиплоидов, при гибридизации сортов картофеля имеет место сложный характер расщепления, что существенно затрудняет отбор желаемых комбинаций генов. Поэтому в настоящее время многие исследователи считают перспективным перевод части селекционного процесса на диплоидный уровень. Основное преимущество отбора на диплоидном уровне по сравнению с традиционной селекцией картофеля – более простое дисомное наследование признаков. Требуется меньший объем гибридных популяций для выделения сложных рекомбинантов, отвечающих запросам селекции, аккумуляция желаемых и элиминация нежелательных генов происходит на диплоидном уровне быстрее, чем на тетраплоидном. Особенно возрастает значимость и результативность отбора на диплоидном уровне при использовании современных методов маркер-сопутствующей селекции, которые основаны на выявлении молекулярных ДНК-маркеров, в частности, маркеров к главным (R)-генам устойчивости к болезням и вредителям [2, 3].

Важнейшее преимущество использования молекулярных маркеров состоит в том, что оно позволяет проводить оценку селекционного материала по генотипу. При необходимости идентификации в организме того или иного гена такая оценка является более точной, чем оценка по фенотипу. Во многих случаях она менее трудоемка и оказывается более дешевой, ее можно применять на ранних этапах селекционного процесса и в любое время года. В настоящее время создан ряд ДНК-маркеров, сцепленных с селекционно-ценными генами картофеля, прежде всего, с генами устойчивости к болезням и вредителям, применение которых позволяет с высокой точностью идентифицировать генотипы-носители соответствующих генов.

Маркер-сопутствующая селекция картофеля на диплоидном уровне в Беларуси ранее не проводилась. В связи с этим стоит задача создания исходного материала для такой селекции. Необходимо, прежде всего, выбрать сорта картофеля различного происхождения, которые являются носителями нескольких генов устойчивости к болезням и вредителям, получить на их основе большое количество дигаплоидов и выделить среди них генотипы с максимально большим количеством генов, имеющихся у исходных сортов. В лаборатории генетики картофеля в 2008-2009 гг. было получено более восьмидесяти первичных дигаплоидов сортов картофеля, отобранных по комплексу селекционно-ценных признаков [4].

Целью настоящей работы была оценка первичных дигаплоидов и исходных сортов на наличие ДНК-маркеров основных генов устойчивости к болезням и вредителям картофеля и отбор среди них перспективных форм для маркерсопутствующей селекции на диплоидном уровне.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали сорта картофеля Блакит, Дубрава, Лилея, Уладар, Lyra, Assia, Carlita, Heidrun, Pirola, Saphir, межвидовые гибриды картофеля (1/4 Koll Podg) и дигаплоиды, полученные на их основе. Клубни сортов картофеля были получены из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству». Межвидовые гибриды были любезно предоставлены профессором А.А. Подгаецким (г. Сумы, Украина). Первичные дигаплоиды (ПД) на основе этих сортов были получены в 2008-2009 гг. в лаборатории генетики картофеля ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» с помощью гаплопродюсера *S. phureja* IvP 35 [4].

Сорта картофеля для исследований были выбраны на основании анализа данных, представленных в каталогах [5], и по результатам оценки по девяти маркерам к доминантным аллелям генов устойчивости к цистообразующей нематоде Globodera rostochiensis, вирусам картофеля PVY, PVX, PLRV, раку картофеля и фитофторозу [6]. Доминантный аллель гена *H1* устойчивости к Globodera rostochiensis, происходящий от S. andigenum, выявляли с помощью косегрегантного к нему SCAR-маркера CP113-5',2/CP113-3'2 [7]. Для идентификации второго гена устойчивости к цистообразующей нематоде *Gro 1-4*, предположительно интрогрессированного от S. spegazzinii, использовали маркер Grol-4 [8]. Для идентификации гена устойчивости к Y вирусу картофеля Ry_{ado} , интрогрессированному в культурный картофель от S. andigenum, использовали SCARмаркер RYSC3 [9]. Для выявления гена иммунности к PVY, происходящего от S. stoloniferum, $Ry-f_{cro}$ использовали CAPS-маркер GP122 [10, 11]. Детекцию гена устойчивости к X вирусу картофеля RxI_{ado} , интрогрессированному в культурный картофель от S. andigenum, производили с помощью CAPS маркера CP60 [8, 12]. Для выявления QTL генов устойчивости к вирусу скручивания листьев PLRVI и PLRV4 использованы SCAR-маркер NL27 и псевдо-SCAR-маркер UBS864R [13]. Доминантный аллель гена SenI устойчивости к раку картофеля диагностировали с помощью SCAR-маркера NL25 [8]. Для выявления гена вертикальной устойчивости к фитофторозу RI_{dms} от S. demissum использовали SCAR-маркер RI_{dms} , [14].

Анализ сортов картофеля и первичных дигаплоидов на наличие у них ДНК-маркеров к генам устойчивости к болезням и вредителям проводили в соответствии с методическими рекомендациями [6]. Выделение и очистку ДНК исследуемых образцов проводили с помощью наборов для выделения и очистки ДНК, разработанных фирмой Fermentas (Литва) «DNA purification Kit» в соответствии с рекомендациями производителя и рядом модификаций, разработанных нами специально для выделения ДНК из растительных тканей картофеля [10]. Концентрацию и степень очистки ДНК проверяли на спектрофотометре и нанесением на агарозный гель. Для того, чтобы исключить случаи отсутствия амплификации из-за низкого качества препаратов, проводили предварительный анализ ДНК отдельных образцов на способность амплифицироваться с ISSRпраймером UBC-857 [10]. ПЦР осуществляли на автоматическом программируемом термоциклере GenAmp System 2700 фирмы «PE Applied Biosystems» (США). Длину амплифицированных фрагментов ДНК определяли визуально при помощи стандартного маркера длин фрагментов ДНК 100 bp + 1.5 Kb + 3 Kb (M27) («DIALATLtd»). Для горизонтального электрофореза в 2%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия брали 7-8 мкл реакционной смеси и 2 мкл 10× бромфенолового-синего. Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1× TAEбуфере в течение 1,5-2 ч при напряжении в 80 V и силе тока 6 mA.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, выбранные для получения дигаплоидов сорта картофеля являются носителями комплекса ценных генов устойчивости к болезням и вредителям. Все они резистентны к цистообразующей нематоде благодаря наличию гена *H1* от *S. andigenum*, а некоторые из сортов (Лилея, Assia, Heidrun,

Lyra и Saphir) несут сразу два гена устойчивости к этому опасному вредителю (*H1* и *Gro 1-4*). Сорта обладают устойчивостью к раку (исключение – сорт Lyra) и к вирусу скручивания листьев, а также имеют отдельные маркеры генов устойчивости к PVY, PVX и фитофторозу.

Таблица 1 Наличие ПЦР-маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям у первичных дигаплоидов и исходных сортов картофеля*

						картофел	PLRV		<i>R1</i>
Иахали ий аарт	H1	Gro 1-4	Ry	Ry	Rx	PLRV	PLKV 4	Sen1	dms
Исходный сорт	adg	spg	adg	sto	adg	1	4	Sen1	ums
и дигаплоиды							LIDE	NII 25	D1
на его основе	CP113	Gro 1-4	ADG2	GP122	CP60	NL27	UBS	NI 25	R1
Блакит	+	0	0	0	0	+	864R +	+	dms 0
IGC 08/6.1	+	0	0	0	0	+	+	+	0
IGC 08/6.1	+	0	0	0	0	+	+	+	0
IGC 08/6.4	+	0	0	0	0	0	+	+	0
Дубрава	+	0	+	0	+	+	+	+	-
IGC 07/9.1	+	0	+	0	0	+	+	+	0
IGC 07/9.2	+	0	0	0	0	+	0	+	0
IGC 07/9.22	+	0	+	0	0	+	+	0	+
IGC 07/9.33	0	0	0	0	0	+	0	0	0
IGC 08/5.11	+	0	+	0	0	+	+	0	0
IGC 09/6.15	+	0	0	0	0	0	+	0	0
IGC 09/6.19	0	0	0	0	0	0	+	0	0
Лилея	+	+	-	-	+	+	+	+	+
IGC 09/8.1	+	0	0	0	0	+	+	0	+
IGC 09/8.3	+	+	0	0	0	+	+	+	0
IGC 09/8.24	+	+	0	0	+	+	+	0	+
Уладар	+	-	-	-	-	+	+	+	+
IGC 09/10.2	+	0	0	0	0	+	+	0	+
Assia IGC 08/7.1	+ +	+ 0	0	0	+ +	+ +	+ +	+ 0	0
IGC 08/7.1	0	+	0	0	+	0	+	0	0
IGC 08/7.7	+	+	0	0	0	+	+	+	0
IGC 08/7.7	+	0	0	0	+	+	+	0	0
IGC 08/7.12	0	+	0	0	0	+	+	+	0
IGC 08/7.12 IGC 08/7.25	+	0	0	0	0	+	+	+	0
IGC 08/7.31	+	+	0	0	0	+	+	0	0
IGC 08/7.37	+	0	0	0	+	0	+	0	0
Carlita	+	0	+	0	+	+	+	+	+
IGC 07/7.1	+	0	+	0	0	+	+	0	0
IGC 08/2.4	0	0	0	0	0	0	+	0	0
IGC 08/2.5	+	0	0	0	0	0	+	0	0
IGC 08/2.7	0	0	0	0	0	0	0	0	+
IGC 09/1.5	+	0	+	0	0	+	+	0	+
Heidrun	+	+	0	+	0	+	+	+	+
IGC 08/3.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IGC 08/3.9	+	0	0	0	0	0	+	0	0
IGC 08/3.10	0	0	0	0	0	0	0	+	0
IGC 08/3.13	+	0	0	0	0	0	0	0	0
IGC 08/3.14 IGC 08/3.15	0 +	0	0	0	0	0	+	0	+
IGC 08/3.15 IGC 08/3.16	+	0	0	0	0	+	+	0	0
IGC 08/3.16 IGC 08/3.17	+	0	0	0	0	0	+	0	0
IGC 08/3.17 IGC 08/3.22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IGC 08/3.22 IGC 08/3.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lyra	+	+	+	-	+	+	+	0	+
IGC 09/9.3	+	0	0	0	0	+	+	0	+
IGC 09/9.4	+	+	0	0	0	+	+	0	+
IGC 09/9.5	+	+	0	0	0	+	+	0	+
IGC 09/9.6	+	+	0	0	+	+	+	0	+
IGC 09/9.10	+	+	+	0	+	+	+	0	+
IGC 09/9.11	+	+	+	0	+	+	+	0	+
IGC 09/9.12	+	0	0	0	0	+	+	0	+

Продолжение табл. 1

Исходный сорт и дигаплоиды на его основе	H1 adg CP113	Gro 1-4 spg Gro 1-4	Ry adg ADG2	Ry sto GP122	Rx adg CP60	PLRV 1 NL27	PLRV 4 UBS 864R	Sen1 NI 25	R1 dms R1 dms
Pirola	+	0	+	0	0	+	+	+	0
IGC 07/6.1	0	0	+	0	0	0	+	0	0
IGC 08/4.1	+	0	0	0	0	0	+	0	0
IGC 08/4.2	0	0	+	0	0	0	+	+	0
IGC 08/4.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saphir	+	+	+	+	-	+	+	+	+
IGC 09/2.1	+	0	0	0	0	+	+	+	+
IGC 09/2.4	+	0	0	0	0	+	+	+	+
IGC 09/2.7	+	+	+	+	0	+	+	0	+
IGC 09/2.8	0	0	0	0	0	+	+	0	+
1/4 Koll Podg	+	-	-	+	+	+	+	+	+
IGC 09/7.3	+	0	0	+	+	+	+	+	+
IGC 09/7.8	+	0	0	0	0	0	+	0	0
IGC 09/7.11	+	0	0	0	0	0	+	0	0

^{*-} «+» – маркер выявлен, «0» – маркер отсутствует, «-» – анализ не проводился.

При переходе на диплоидный уровень в результате расщепления, имеющего место при получении дигаплоидов, часть ПЦР-маркеров теряется. Некоторые маркеры, например, Gro 1-4 в потомстве сорта Heidrun или NL 25 в потомстве сорта Carlita, CP60 в потомстве сорта Carlita у соответствующих дигаплоидов не представлены. Очевидно, это связано с тем, что в исходных сортах названные гены находятся в симплексном состоянии. Тем не менее, нам удалось получить дигаплоиды, несущие маркеры к таким генам. В частности, маркер к ценному гену устойчивости к цистообразующей нематоде Gro 1-4 выявлен у дигаплоидов сортов Лилея, Assia, Lyra и Saphir. Дигаплоиды с маркером СР60 к гену устойчивости к PVX были получены у сортов Лилея, Assia, Lyra, а маркер GP122 гена устойчивости к PVY был выявлен у дигаплоидов сорта Heidrun и межвидовых гибридов. Носители маркера NL 25 устойчивости к раку картофеля встречались среди дигаплоидов всех сортов, кроме Carlita и Lyra. Согласно данным каталога Европейских сортов картофеля [15], сорт немецкого происхождения Lyra обладает высокой полевой устойчивостью к раку картофеля, которую определяли как в полевых тестах, так и лабораторными методами. Можно сделать предположение, что устойчивость к расе 1 рака картофеля этого сорта определяется другими генами.

В то же время большое количество первичных дигаплоидов получили от родительских сортов QTL устойчивости к PLRV (*PLRV1* и *PLRV4*) и ген *H1* устойчивости к цистообразующей нематоде, что позволяет говорить о том, что эти гены находятся в исходных сортах в мультиплексном состоянии (дуплекс и выше). Это же, по-видимому, относится к гену устойчивости к раку у сорта Блакит: маркер Nl 25 был выявлен у всех изученных дигаплоидов данного сорта.

Из табл. 1 видно, что клоны первичных дигаплоидов имеют два и более ДНК-маркера к селекционно-ценным генам. Особенно насыщены маркерами популяции первичных дигаплоидов, полученных на основе немецких сортов Assia, Lyra, Saphir и белорусского сорта Дубрава. В частности, клоны IGC 09/9.10 и IGC 09/9.11 сорта Lyra и клон IGC 09/2.7 сорта Saphir несут семь таких генов. Клоны IGC 09/9.4, IGC 09/9.5, IGC 09/9.6 сорта Lyra и IGC 09/2.1 и IGC 09/2.4 сорта Saphir несут 5-6 генов устойчивости. Среди дигаплоидов других сортов также встречались генотипы с большим количеством маркеров. По семь генов устойчивости удалось обнаружить у дигаплоида IGC 09/7.3 (1/4 Koll Podg), по 5-6 генов устойчивости было у дигаплоидов IGC 07/9.1, IGC 07/9.22 (сорт Дубрава), IGC 09/1.5 (copt Carlita), IGC 09/8.3, IGC 09/8.24 (сорт Лилея).

Интересны дигаплоиды, несущие по два гена устойчивости к нематоде, происходящие от разных источников, а также два основных QTL устойчивости к PLRV. Это делает их перспективными при одновременной селекции на устойчивость к нематоде и L-вирусу картофеля. Это клоны IGC 08/7.7, IGC 08/7.31 (сорт Assia), IGC 09/2.7 (copt Saphir), IGC 09/8.3, IGC 09/8.24 (сорт Лилея), IGC 09/9.10, IGC 09/9.11, IGC 09/9.4, IGC 09/9.5, IGC 09/9.6 (сорт Lyra). Дигаплоид сорта Saphir 09/2.7, а также клон 09/7.3 (1/4 Koll Podg) имеют особую ценность, поскольку из всех изученных дигаплоидов только у них обнаружен маркер GP122 гена устойчивости к PVY от S. stoloniferum. У последнего клона также одновременно присутствует маркер другого гена устойчивости к этому вирусу, происходящий от S. andigenum.

Отдельный интерес представляют клоны ПД, несущие гены устойчивости к раку картофеля. В частности, устойчивыми являются все сорта белорусской селекции, что не удивительно, так как устойчивость к карантинному заболеванию раком картофеля является одним из обязательных условий при создании современных сортов в нашей стране. ПЦР-маркер NL25 является показателем наличия доминантного аллеля гена Sen1. К сожалению, наличие этого аллеля у исходных сортов не гарантирует его присутствие у первичных дигаплоидов, получаемых на основе этих сортов. Например, ни один из

полученных нами первичных дигаплоидов сорта Carlita не унаследовал доминантный аллель гена устойчивости. Судя по низкой частоте появления в диплоидном потомстве тетраплоидных сортов доминантного аллеля гена Sen1, в самих сортах он, по-видимому, чаще присутствует в симплексном состоянии.

В целом среди 55 первичных дигаплоидов, полученных в 2008 и 2009 гг. и прошедших ПЦР-анализ в 2010 и 2011 гг., удалось выделить 51 генотип, несущий те или иные маркеры генов устойчивости к болезням, в том числе 30 клонов, несущих 4 и более гена устойчивости. Все 9 ПЦР маркеров, выявленные в исходных сортах, были обнаружены и у их дигаплоидов. Это означает, что селекцию на диплоидном уровне можно проводить по всем проанализированным генам. Этот результат достигнут во многом благодаря тому, что перед получением дигаплоидов картофеля была проведена предварительная работа по изучению характеристик сортов в каталогах, а также их генотипическая оценка на наличие нескольких генов устойчивости к болезням и вредителям. Если среди первичных дигаплоидов, полученных нами ранее, в 1997-1998 гг., только отдельные образцы несли более 2 маркеров к генам устойчивости, а у многих такие маркеры отсутствовали вовсе, то среди дигаплоидов, полученных в 2008 и 2009 гг., доля генотипов, несущих несколько ДНК маркеров, оказалась гораздо выше.

Заключение

Оценка первичных дигаплоидов по ДНК-маркерам к 9 генам устойчивости к основным болезням и вредителям картофеля позволила выделить образцы, несущие одновременно до 7 генов устойчивости. Предварительный ПЦР-анализ исходных сортов на наличие маркеров позволяет существенно повысить насы-

щенность соответствующих первичных дигаплоидов доминантными аллелями R-генов. Отобран ряд дигаплоидов, представляющих интерес для использования в качестве исходного материала для маркер-сопутствующей селекции на комплексную устойчивость к болезням и вредителям.

Список использованных источников

- 1. Иванюк, В.Г. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В.Г. Иванюк, С.А. Банадысев, Г.К. Журомский. Минск: Белпринт, 2005. 696 с.
- 2. Gebhardt, Ch. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome /
- Ch. Gebhardt, J.P.T. Valkonen // Annu. Rev. Phytopathol. 2001. Vol. 39. P. 79–102.
- 3. Barone, A. Molecular marker-assisted selection for potato breeding / A. Barone // American J. Potato Res. -2004. Vol. 81, N_{\odot} 2. P. 111–117.

- 4. Получение и отбор дигаплоидов *S. tuberosum*, перспективных для маркерсопутствующей селекции на комплексную устойчивость к болезням и вредителям / Е.В. Воронкова [и др.] // Картофелеводство. Минск, 2011. Т. 19 (в печати).
- 5. Сорта картофеля: каталог / Н.Н. Гончарова [и др.] // РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству». Минск, 2007. 96 с.
- 6. Ермишин, А.П. Оценка исходного материала картофеля для селекции на устойчивость к болезням и вредителям с помощью специфических ПЦР-маркеров: методические рекомендации / А.П. Ермишин [и др.]. ГНУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. Минск: Экономика и право, 2010. 60 с.
- 7. Niewohner, J. Development of PCR assays diagnostic for RFLP marker to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato / J. Niewohner, F. Salamini., C. Gebhardt // Molecular Breeding. 1995. Vol. 1. P. 65–78.
- 8. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato / C. Gebhardt [et al.] // Theor. Appl. Genet. 2006. Vol. 112. P. 1458–1464.
- 9. Wenzel, G. Breeding for nematode and virus resistance in potato via another culture / G. Wenzel, H. Uhrig // Theor. Appl. Genet. 1981. Vol. 59. P. 333–340.
- 10. Ry-fsto gene from Solanum stoloniferum for extreme resistant to Potato virus Y maps to

- potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122718 in PVY resistant potato cultivars / B. Flis [et al.] // Molecular Breeding. 2005. Vol. 15, №1. P. 95–101.
- 11. Лисовская, В.М. Оценка интрогрессии генов аллотетраплоидных видов картофеля в геном *Solanum tuberosum* с помощью произвольных праймеров / В.М. Лисовская // Молодежь в науке-2006: Материалы международной конференции // Вести НАН Беларуси, сер. биол. наук. 2006. №5. С. 119–123.
- 12. Bendahmane A. High-resolution genetical and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato / A. Bendahmane, K. Kanyuka, D.C. Baulcombe // Theor. Appl. Genet. 1997. Vol. 95. P. 153–162.
- 13. Two allelic or tightly linked genetic factors at the PLRV.4 locus on potato chromosome XI control resistance to potato leafroll virus accumulation / W. Marczewski [et al.] // Theor. Appl. Genet. − 2004. Vol. 109, №8. P. 1604–1609.
- 14. Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers / C.A. Bormann [et al.] // Mol. Plant Microbe Interaction (MPMI). 2004. Vol. 17, No.10 P. 1126–1138.
- 15. Международная Европейская база данных по картофелю // Европейская ассоциациация исследователей по картофелю (EAPR) [Электронный ресурс]. 2011. Режим доступа: http:// www.europotato.org. Дата доступа: 10.11.2011.

Дата поступления статьи 25 ноября 2011 г.

О.Ю. Урбанович¹, З.А. Козловская², П.В. Кузмицкая¹, Н.А. Картель¹

АССОЦИАЦИЯ АЛЛЕЛЯ *MdMYB1-1* С КРАСНОЙ ОКРАСКОЙ КОЖИЦЫ ПЛОДОВ ЯБЛОНИ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27 ²РУП «Институт плодоводства» Республика Беларусь, 223013, Минская обл., Минский р-н, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

Введение

Сорта яблони, важнейшей плодовой культуры в Беларуси, имеют плоды различной окраски кожицы: от зеленой, как у сорта Память Вавилова, до темно-красной, как у сорта Память Коваленко. У многих сортов кожица плодов окрашена неравномерно, имеет штрихи или румянец, который может быть выражен в разной степени даже среди плодов одного сорта. Цвет плодов яблони является не только отличительной чертой, характеризующей сорт, но и важным критерием, который влияет на выбор потребителем того или иного сорта яблок. Покупатели часто отдают предпочтение сортам с красными плодами. Плоды с красной окраской ассоциируются с лучшей спелостью, и соответственно, с лучшим вкусом и ароматом [1].

Красный цвет плодов яблони главным образом определяется присутствием вторичных метаболитов – антоцианов [2, 3]. Интенсивность красной окраски кожицы плодов непосредственно зависит от степени накопления этих природных антиоксидантов. Следует отметить, что помимо антоцианов, в окраске фруктов принимают участие каротиноиды и хлорофилл [4]. Накопление антоцианов во фруктах варьирует в широком пределе и изменяется в зависимости от стадии зрелости и условий окружающей среды. Наиболее спелые плоды, хорошо освещенные солнцем в процессе роста, имеют более насыщенную окраску и соответственно более высокое содержание антоцианов в кожуре по сравнению с незрелыми, плохо освещенными солнечными лучами плодами того же сорта [5].

Антоцианы синтезируются по флавоноидному пути, который является ветвью фенилпропаноидного пути [6]. Основная его регуляция происходит на уровне транскрипции структурных генов, кодирующих ферменты. В геноме растений обнаружено три семейства генов, регулирующих синтез антоцианов – MYB, bHLH и WDR [5, 6]. Накопление антоцианов зависит от скоординированной экспрессии этих генов. Процесс индуцируется солнечным светом [4]. Показано, что за накопление антоциана в плодах яблони ответственен транскрипционный фактор МҮВ [7]. В геноме яблони обнаружены три варианта данного транскрипционного фактора, получивших название МҮВ1, МҮВ10 и МҮВА [8]. Они имеют высокий уровень гомологии нуклеотидного состава кодирующего региона и, возможно, являются аллельными [9]. Степень их влияния на окраску кожицы плодов яблони исследована недостаточно.

Целью данного исследования являлось определение аллельного состава гена *MdMYB1* у сортов яблони различной окраски и анализ возможности использования информации о составе аллелей данного гена для прогнозирования окраски кожицы плодов. В исследовании были использованы сорта, произрастающие в данном климатическом регионе.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 104 сортах яблони различной окраски. Сорта были отобраны из коллекции РУП «Институт плодоводства». Среди них — белорусские, российские, украинские со-

рта, сорта селекции других стран, представляющие интерес для дальнейшей селекционной работы. Выбранные сорта отличались по наличию и степени покровной окраски кожицы плодов.

Оценка цвета плодов проводилась визуально по наличию и степени интенсивности красной окраски. Были выделены следующие 5 групп сортов: сорта с темно-красной и пурпурной окраской, с красной окраской, со средней степенью окраски, со слабой окраской и сорта, не имеющие красной окраски.

Из листового материала представителя каждого сорта были выделены препараты ДНК. Выделение ДНК проводили с помощью Genomic DNA Purification Kit фирмы Fermentas согласно рекомендованному протоколу.

Для идентификации аллелей гена *MdMYB1* применяли молекулярные маркеры, выявляемые в результате ПЦР. Реакцию проводили с помощью dCAPS маркеров в соответствии с [10]. Праймеры синтезированы компанией Праймтех (Беларусь).

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 40 нг ДНК, 75 мМ трис-HCl (pH 8.8 при 25 °C), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 0,2 мМ dNTP, 200 мМ каждого праймера, 1 ед. Таq-полимеразы.

Реакцию амплификации проводили в следующем режиме: І-й этап: 1 цикл: 94 °C - 4 мин; ІІ-й этап: 40 циклов: 94 °C - 40 сек; 55 °C - 1 мин; 72 °C - 2 мин; ІІІ-й этап: 1 цикл: 72 °C - 8 мин.

Продукты амплификации обрабатывали рестриктазой *BstEII* (Fermentas) в течение 2 часов при 37 °С в буфере, рекомендованном производителем.

Полученные фрагменты разделяли в 1% агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания этидиум бромидом. В качестве маркера молекулярного веса использовали 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Присутствие аллеля *MdMYB1-1* определяли по наличию фрагмента амплификации размером в 263 п.н., который образовывался после разрезания апликонов рестриктазой *BstEII*. Фрагменты амплификации, соответствующие аллелям *MdMYB1-2* и *MdMYB1-3*, имели размер 292 п.н.

Результаты и обсуждение

В сформированной коллекции яблони наличие красной окраски плодов в той или иной степени было отмечено у 90 сортов из

104. В группу, у которой красная окраска отсутствовала, было отнесено 14 сортов (табл. 1).

 Таблица 1

 Распределение аллеля MdMYB1-1 среди групп сортов яблони различной окраски

Окраска плодов	Присутствует аллель <i>MdMYB1-1</i>	%	Отсутствует аллель <i>MdMYB1-1</i>	%2	Всего образцов
Темно-красная окраска	14	100,0	0	0,0	14
Красная	21	87,5	3	12,5	24
Средняя степень окраски	25	100,0	0	0,0	25
Слабая окраска	15	55,6	12	44,4	27
Отсутствие красной окраски	2	14,3	12	85,7	14

В геноме каждого сорта был определен состав аллелей гена *MdMYB1*. Для данного гена известно три аллеля — *MdMYB1-1*, *MdMYB1-2*, *MdMYB1-3*. Изначально аллель *MdMYB1-1* был обнаружен у растений с красной окраской кожицы плодов, в то время как два других (*MdMYB1-2* и *MdMYB1-3*) были выявлены в геноме растений, не имеющих красной окраски [10].

Результаты анализа, проведенного с помощью молекулярных маркеров к гену *MdMYB1*, показа-

ли, что у 77 образцов яблони из 104 присутствует аллель MdMYB1-1, что составляет 74% от общего числа рассмотренных сортов. Данные по аллельному составу групп сортов с разной степенью наличия красной окраски приведены в табл. 1. Как видно из представленных данных, 100% сортов яблони, имеющих темно-красную окраску плодов, имеют аллель MdMYB1-1. Такой же процент соответствия у сортов, имеющих плоды со средней степенью проявления красной окраски, в то время

как 12,5% сортов, имеющих плоды красной окраски и 44,4% яблонь с плодами со слабой красной окраской, не имеют аллеля *MdMYB1-1*.

В геноме 85,7% сортов яблони, плоды которых не имеют красной окраски, аллель, ассоциированный с

красной окраской, не представлен (рис. 1). В целом, степень ассоциации маркера с признаком окраски кожицы плодов по результатам исследования данной коллекции составляет 83,8%. Это достаточно высокий уровень ассоциации маркера с признаком.

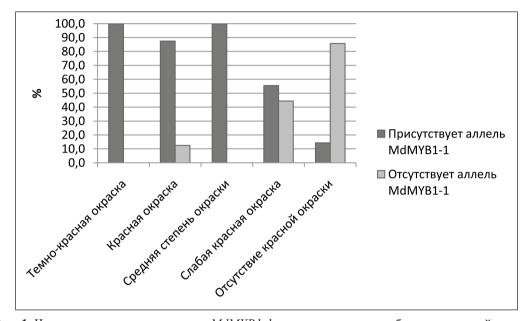


Рис. 1. Частота встречаемости аллеля *MdMYB1-1* среди групп сортов яблони различной окраски

Достоверно высокое соответствие между присутствием аллеля *MdMYB1-1* и красной окраской кожицы плодов было отмечено Zhu с соавторами [11]. Они показали, что 86% сеянцев, полученных от скрещивания Golden Delicious × Arlet, и 80% сеянцев из семьи Honeycrisp × Cripps Pink демонстрируют ассоциацию между генотипом и фенотипом. Авторы высказали предположение, что проявление признака красной окраски кожицы плодов зависит от генетического окружения.

Следует отметить, что ген *MdMYB1*, аллели которого были определены в представленном

исследовании, кодирует транскрипционный фактор, запускающий путь биосинтеза антоцианов. Аллели данного гена оказывают большое влияние на проявление красной окраски кожицы, однако, как показывают проведенные исследования, не обязательно будет указывать на наличие желаемого признака у носителя определенной аллельной формы. Результаты наблюдения за проявлением признака показали, что у части сортов, имеющих красную окраску, аллель *MdMYB1-1* отсутствует. В тоже время он присутствует у некоторых сортов с зеленой окраской (табл. 2).

 Таблица 2

 Распределение аллеля MdMYB1-1 среди сортов яблони различной окраски

Название сорта	Страна происхождения	Генотип	Фенотип
Алеся	Беларусь	+	+
Амулет	Украина	+	+
Антей	Беларусь	+	+
Антоновка обыкновенная	Старорусский	-	-
Ауксис	Литва	+	+
Афродита	Россия	+	+
Бабушкино	Россия	-	-
Банановое	Беларусь	-	+
Белорусский синап	Беларусь	-	+
Белорусское летнее	Беларусь	+	+

Продолжение табл. 2

Название сорта	Страна происхождения	Генотип	Фенотип	
Алеся	Беларусь	+	+	
Амулет	Украина	+	+	
Антей	Беларусь	+	+	
Антоновка обыкновенная	Старорусский	-	-	
Ауксис	Литва	+	+	
Афродита	Россия	+	+	
Бабушкино	Россия	-	_	
Банановое	Беларусь	-	+	
Белорусский синап	Беларусь	-	+	
Белорусское летнее	Беларусь	+	+	
Белорусское малиновое	Беларусь	+	+	
Белорусское сладкое	Беларусь	+	+	
Белый налив	Старорусский	-	_	
Боровинка	Беларусь	+	+	
Вербнае	Беларусь	+	+	
Весялина	Беларусь	+	+	
Ветеран	Россия	+	+	
Дарунак	Беларусь	+	+	
Долго	США	+	+	
Елена	Беларусь	+	+	
Заря Алатау	Казахстан	+	+	
Заславское	Беларусь	+	+	
Имант	Беларусь	+	+	
Кандиль орловский	Россия	+	+	
Коваленковское	Беларусь	+	+	
Коробовка крупноплодная	Беларусь		+	
Коштеля	Польша			
Лошицкое		+	-	
	Беларусь	+	+	
Лучезарное	Беларусь	+	+	
Медуница	Россия			
Мечта	Россия	+	+	
Минское	Беларусь	+	+	
Надзейны	Беларусь	-	+	
Несравненное	Беларусь	-	+	
Новинка осени	Беларусь	-	-	
Новое сладкое	Беларусь	-	-	
Орловим	Россия	+	+	
Осеннее полосатое	Германия	+	+	
Осмоловка	Беларусь	+	+	
Память Вавилова	Беларусь	+	-	
Память Исаева	Россия	+	+	
Память Коваленко	Беларусь	+	+	
Память Пашкевича	Беларусь	-	-	
Память Сикоры	Беларусь	+	+	
Память Сюбаровой	Беларусь	+	+	
Папировка	Старорусский	-	-	
Пепин литовский	Беларусь	-	+	
Пепин литовский улучшенный	Беларусь	-	-	
Пепинка золотистая	Украина	-	+	
Первинка	Россия	+	+	
Перлына Киева	Украина	+	+	
Поспех	Беларусь	+	+	
Ребристое	Беларусь	-	-	
Свежесть	Россия	+	+	
Серуэл	Беларусь	+	+	
Синап орловский	Россия	-	+	
Скала	Россия	+	+	
Слава победителям	Украина	+	+	
Солнышко	Россия	+	+	

Продолжение табл. 2

Название сорта	Страна происхождения	Генотип	Фенотип	
Старт	Россия	+	+	
Стойкое	Беларусь	+	+	
Строевское	Россия	+	+	
Сябрына	Беларусь	+	+	
Теллисааре	Эстония	-	+	
Утро	Украина	-	-	
Цыганочка	Украина	+	+	
Чаравница	Беларусь	+	+	
Черное дерево	Старорусский	-	-	
Чулановка	Россия	+	+	
Щедрое	Беларусь	-	-	
Юбиляр	Россия	+	+	
84-51/9	Беларусь	+	+	
84-39/58	Беларусь	+	+	
Alkmene	Germany	+	+	
BM41497	Sweden	+	+	
Elstar	Netherlands	+	+	
Empire	USA	+	+	
Fiesta	Great Britain	+	+	
Florina	France	+	+	
Freedom	USA	+	+	
Gravenstein	Germany	+	+	
Idared	USA	+	+	
Jonafree	USA	-	+	
Jonagold de Costa	Belgium	+	+	
Jupiter Jupiter	Great Britain	+	+	
Kent	Great Britain	+	+	
Lawfam	Canada	+	+	
Сеянец Лавфама	Беларусь	+	+	
McIntosh	Canada	+	+	
Melba	Canada	+	+	
Otava	Czech Republic	-	+	
Pinova	Germany	+	+	
Red Boskoop	Netherlands	+	+	
Red silver	USA	-	+	
Redfree	USA	-	+	
Retina	Germany	+	+	
Rewena	Germany	+	+	
Sawa	Poland	+	+	
SR0523	USA	+	+	
Topaz	Czech Republic	+	+	
Wealthy	USA	+	+	
Witos	Poland	+	+	
K:1211	Sweden	+	+	
K:+343	Sweden	+	+	
K:1431	Sweden	-	+	
IV.11771	Sweden	-	<u> </u>	

^{*} – знаки «+» и «-» в колонке генотип обозначают, что в геноме присутствует или отсутствует аллель MdMYB1-1;

Таким образом, результаты, представленные в данном исследовании, а также результаты, полученные другими авторами, указывают на то, что помимо аллельного состава гена *MdMYB1*, на окраску кожицы плодов яблок оказывают влияние и другие факторы.

Так, в частности, А.Телиас с соавторами

продемонстрировал, что накопление антоцианов в кожуре плодов яблони может контролироваться эпигенетически [12]. Исследуя плоды с пестрой окраской, авторы показали, что уровень накопления антоцианов различался в отдельных клетках кожицы яблок. Содержание антоцианов понижено в зеленых

^{**} – знаки «+» и «-*» в колонке фенотип обозначают наличие или отсутствие красной окраскикожицы плодов яблони.

участках кожицы относительно красных. Причиной этого явления оказалось снижение уровня транскрипции генов антоцианового пути биосинтеза, в том числе регулирующего этот путь транскрипционного фактора МҮВ10. В зеленых участках кожицы отмечен более высокий уровень метилирования промоторной области гена, кодирующего транскрипционный фактор МҮВ10, по сравнению с областями с красной окраской. Авторы считают, что уровень метилирования промоторной области гена МҮВ10 оказывает влияние на степень накопления антоцианов в кожуре яблок с пестрой окраской. На изменение уровня метилирования в свою очередь может оказывать влияние присутствие мобильного элемента TRIM. Он был обнаружен на расстоянии 2.5 т.п.н. перед предсказанным сайтом начала транскрипции гена МҮВ10 [12].

Влияние степени метилирования на уровень транскрипции гена *MdMYB1* было также обнаружено при исследовании сорта Ralls, имеющего полосатую окраску плодов, и его мутантной формы с румяной окраской плодов [13]. Уровень метилирования ДНК про-

моторной области гена *MdMYB1* оказался достоверно ниже у мутантной формы с румяной окраской плодов. Соответственно мутантная форма характеризовалась более высоким уровнем транскрипции гена. При этом сорт Ralls и его мутантная форма не имели отличий в составе нуклеотидных последовательностей как гена *MdMYB1*, так и его промоторной области. Вместе с тем отмечены случаи, когда причиной изменения уровня экспрессии могут быть изменения в структуре промоторной области соответствующих генов. Так, инсерция минисателлита в промоторном регионе гена МҮВ10 приводит к увеличению его транскрипции и повышению уровня содержания антоцианов у форм яблони с красным цветом листьев и мякоти плодов [14].

Похожее явление обнаружено не только у яблони. Ранее было показано влияние регуляторных генов антоцианового пути на проявление пестрой окраски у семян кукурузы [15]. У некоторых светлых сортов винограда причиной отсутствия пигмента является ретротранспозон-индуцибельная мутация в промоторной области гена *VvmybA1* [16].

Заключение

Таким образом, окраска плодов яблони может зависеть от множества факторов. Помимо условий окружающей среды и генов, кодирующих структурные ферменты, участвующие в каталитических реакциях синтеза вторичных метаболитов, на ее формирование оказывает влияние аллельный состав регуляторных генов, уровень их экспрессии, определяемый состоянием их промоторных областей. В результате, наличие аллеля *MdMYB1-1* в геноме образцов яблони не может гарантировать проявление признака, а указывает только на более высокую вероятность проявления красной окраски кожицы плодов. Для точного прогнозирования признака окраски необходима разработка дополнительных подходов.

Список использованных источников

- 1. Development of a model for prediction of consumer linking from visual attributes of new and established apple cultivars / M.C. King, M.A. Cliff//J. Am. Pom. Soc. 2002. Vol. 56. P. 223–229.
- 2. Antioxidant activity of fresh apples / M.V. Eberhardt, C.Y. Lee, R.H. Liu // Nature. 2000. Vol. 405. P. 903–904.
- 3. Relationship between apple peel and the whole fruit antioxidant content: year and cultivar variation / B. Lata // J. Agr. Food Chem. − 2007. − Vol. 55, №663–671.
- 4. Regulation of skin color in apples / J.E. Lancaster // CRC Crit Rev Plant Sci. 1992. Vol. 10. P. 487–502.
- 5. External control of anthocyanin formation in apple / M.C. Saure // Sci. Hort. 1990. Vol. 42. P. 181–218.
- 6. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology / B. Winkel-Shirley // Plant Physiology. 2001. Vol. 126. P. 485–493.
- 7. Red coloration in apple fruit is due to the activity of the *MYB* transcription factor,

- *MDMYB10* / R.V. Espley [et al.] // Plant J. 2007. Vol. 49. P. 414–427.
- 8. Isolation and functional analysis of a *MYB* transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin / Y. Ban [et al.] // Plant Cell Physiol. 2007. Vol. 48. P. 958–970.
- 9. An R2R3 *MYB* transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae / K. Lin-Wang [et al.] // BMC Plant Biol. 2007. Vol. 10. P. 50.
- 10. Light-induced expression of a *MYB* gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples / A.M. Takos [et al.] // Plant Physiol. 2006. Vol. 142. P. 1216–1232.
- 11. Utility testing of an apple skin color *MdMYB1* marker in two progenies / Y. Zhu, K. Evans, C. Peace // Molecular Breeding. 2010. Vol. 27. P. 525–532.

- 12. Apple skin patterning is associated with differential expression of *MYB10* / A. Telias [et al.] // BMC Plant Biology. 2011. Vol. 11, №93
- 13. Comparison of *MdMYB1* sequences and expression of anthocyanin biosynthetic and regulatory genes between Malus domestica Borkh. cultivar 'Ralls' and its blushed sport / Y. Xu [et al.] // Euphytica. 2011. on-line
- 14. Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples / R.V. Espley [et al.] // Plant Cell. 2009. Vol. 21. P. 168–183.
- 15. Pl-Bh, an anthocyanin regulatory gene of maize that leads to variegated pigmentation / S.M. Cocciolone, K.C. Cone // Genetics. 1993. Vol. 135. P. 575–588.
- 16. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color / S. Kobayashi, N. Goto-Yamamato, H. Hirochika // Science. 2004. Vol. 304. P. 982.

Дата поступления статьи 16 ноября 2011 г..

А.А. Булойчик, Е.А. Волуевич, В.С. Борзяк

ИЗУЧЕНИЕ ДОНОРСКИХ СВОЙСТВ У ГРУППЫ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ – ИСТОЧНИКОВ УСТОЙЧИВОСТИ К SEPTORIA NODORUM BERK.

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Значительным резервом повышения продуктивности основной зерновой культуры мира – пшеницы – может быть снижение ущерба от септориозной пятнистости, вызываемой Septoria nodorum Berk. Недобор урожая зерна от этой болезни составляет от 9-15% при умеренном поражении посевов и до 32-55% в годы эпифитотий [1, 2]. В Республике Беларусь эпифитотии септориоза происходят практически ежегодно [3] и могут приводить к снижению урожая зерна до 20-30% [4]. В последнее время наблюдается почти повсеместное усиление развития септориоза.

Наиболее рентабельным средством борьбы с болезнями и вредителями культурных растений является выведение и возделывание резистентных сортов. В отличие от биотрофных патогенов, обладающих высоким уровнем физиологической специализации, возбудитель септориоза имеет широкий круг потенциальных растений-хозяев из различных таксономических групп, он также может развиваться на искусственных питательных средах и мертвых растительных субстратах. При взаимодействии S. nodorum с питающими растениями не наблюдается их полной резистентности, можно лишь судить о разной степени восприимчивости или частичной устойчивости.

Впервые о наследовании признака септориозоустойчивости сообщили Laubscher с соавторами [5]. У высоко резистентной линии 62/345 они предположили наличие доминантных генов устойчивости. Frecha [6] описал моногенное доминантное наследование устойчивости у озимого сорта Atlas 66. Wong и Hughes [7] установили моногенный рецессивный контроль проростковой устойчивости у трех озимых сортов. По данным моносомного анализа, резистентность сорта Red Chief определяется одним частично рецессивным геном, локализованным в хромосоме 3А [8]. Устойчивость образца ЕЕ 8 обусловливается действием двух частично рецессивных генов, один из которых локализован в хромосоме 3А, а другой, менее эффективный – в 2A.

Лупей с соавторами [9] исследовали генетический контроль устойчивости к *S. nodorum* у линии мягкой яровой пшеницы Transec. При одновременном заражении гибридных растений изолятом возбудителя септориоза и клоном возбудителя бурой ржавчины, авирулентным к гену *Lr 25*, было установлено, что высокая степень резистентности этой линии к *S. nodorum* связана с присутствием в ее геноме частично рецессивного гена, который локализован на пшенично-ржаной транслокации T4BS.4BL-5RL либо тесно сцеплен с ней.

Материалы и методы

Для изучения генетики устойчивости мягкой пшеницы к Septoria nodorum Berk. были получены F_1 и F_2 гибриды от скрещивания 18 сравнительно устойчивых озимых и 8 яровых сортов мягкой пшеницы с восприимчивыми яровыми сортами Chinese Spring и Иволга. Характеристика резистентности родительских форм представлена в табл. 1.

Оценку устойчивости гибридов F_1 , F_2 и исходных родительских форм проводили с использованием методики капельной инокуляции отрезков листьев 9-дневных проростков. Для этого растения выращивали в климатической камере при температуре 20-22 °C, освещенности 10 клк и фотопериоде 16 ч в эмалированных кюветах

на слое ваты, смоченной водой. Из дистальной части листа 9-дневных проростков вырезали сегмент длиной 3 см. Отрезки листьев каждой анализируемой комбинации скрещивания и родительских сортов раскладывали в эмалированные кюветы на слой 0,7% агара с добавлением 40 мг/л бензимидазола. В качестве инокулюма использовали суспензию пикноспор высокоагрессивного изолята №9Мн возбудителя септориоза.

Отрезки листьев заражали путем нанесения микродозатором в центр каждого из них капли инокулюма объемом 3 мкл с концентрацией 10⁶ спор/мл. Для того чтобы капли не скатывались с отрезков, в суспензию добавляли Tween 80 (1 капля/100 мл). Кюветы с инокулированными отрезками помещали в полиэтиленовые пакеты, в течение суток инкубировали на рассеянном свету при комнатной температуре, а затем переносили в климокамеру с описанным выше режимом. Через 7 дней после заражения учитывали длину образовавшихся некротических пятен, просматривая их под бинокуляром с окуляр-микрометром при увеличении 16х.

По реакции на заражение гибриды F_2 были поделены на два класса: относительно устойчивые и восприимчивые. В качестве границы между классами было принято максимальное значение длины инфекционного пятна, развивающегося на отрезках устойчивого родителя. Для сравнения полученных расщеплений с теоретически ожидаемыми использовали критерий χ^2 .

Таблица 1 Резистентность к изоляту №9Мн возбудителя септориоза сортов мягкой пшеницы, используемых в гибридизации

Название сорта (сортообразца)	Тип развития	Степень резистентности к септориозу (длина некротического пятна, мм)			
		минимальная	максимальная	средняя	
Chinese Spring	яровой	6	10	6,2	
Иволга	яровой	6	9	6,2	
Coastal	яровой	1,5	3	2,4	
Coker 47-27	яровой	1	4	3,2	
Cotipora	яровой	1,6	2,8	2,3	
Fiume	яровой	1,9	3	2,7	
Frondoso	яровой	2,8	4,0	3,4	
Mara	яровой	1,2	3	2,2	
Toropi	яровой	1,4	3	2,3	
ИЛ-1	яровой	0,8	1,5	1,1	
Burgas 2	озимый	1	2,5	1,6	
Carifen 12	озимый	2,5	4	3,5	
Coker 68-8	озимый	1	3	2,0	
Hand	озимый	1	2	1,4	
Harvest Queen	озимый	1	3	1,8	
HC	озимый	2,5	3,5	3,1	
Neuzuchtung	озимый	1	2,5	1,8	
Redhart	озимый	1	3,5	2,2	
Transfer	озимый	1	3	2,3	
Disponent	озимый	1	3	2,3	
Flex	озимый	1	2,5	1,6	
Jamhill	озимый	1,5	3,5	2,4	
Moro	озимый	1	2	1,5	
Oenus	озимый	1	3,5	2,3	
Sage	озимый	1	2,5	1,4	
Wiehenstephan 625/65	озимый	1	2	1,8	
Заря	озимый	1	1,8	1,6	
PI 525450	озимый	2	4	3,3	

Результаты и обсуждение

С использованием камеры регулируемого режима была дана оценка устойчивости гибридов F_1 на стадии проростков. В двух комбинациях скрещивания выявлено доминирование (Chinese Spring×Frondoso, Chinese Spring×Mara), в 34 – промежуточное наследование признака устойчивости с уклонением в сторону восприимчивого родителя.

При анализе устойчивости к септориозу гибридов F_2 не выявлено дискретного расщепления на четкие классы по длине некротического пятна. Изменчивость по этому признаку носила непрерывный характер. Гибридных растений, значительно превышающих по резистентности изучаемые сорта или по восприимчивости сорта Chinese Spring и Иволга, не обнаруживалось.

В большинстве проанализированных гибридных комбинаций относительно устойчивые сегреганты составляли более 30% от общего числа растений.

Анализ расщепления в F_2 гибридов, полученных с участием сорта Тогорі и интрогрессивной линии ИЛ-1, показал соответствие теоретически ожидаемому расщеплению 25:39. Такое наследование отмечалось вне зависимости от генотипа использованного восприимчивого родителя. Следовательно, признак резистентности к септориозу у этих устойчивых форм контролируется тремя генами: одним основным геном и двумя генамимодификаторами (усилителем и ингибитором), влияющими на экспрессию основного генетического фактора.

При гибридизации сортов Coastal и Transfer с восприимчивыми родительскими формами расщепление в F_2 соответствовало схеме 21:43, что свидетельствует о трехгенном контролировании устойчивости у этих сортов (один основой доминантный ген и два комплементарных рецессивных гена-ингибитора).

Анализ наследования устойчивости к септориозу у сортов Frondoso и Мага показал, что в комбинациях скрещивания с сортом Chinese Spring соотношение устойчивых и восприимчивых растений в F_2 соответствовало схеме 9:7. Таким образом, резистентность этих сортов к септориозу обусловлена взаимодействием двух доминантных комплементарных генов устойчивости. Однако при скрещивании

с восприимчивым сортом Иволга обнаружено соответствие теоретически ожидаемому расщеплению 19:45 или 21:43. Это свидетельствует о возможности участия в контролировании признака септориозоустойчивости трех генов, что обусловлено особенностями генетического фона восприимчивого родителя. При расщеплении 19:45 резистентность контролируется одним основным геном и двумя комплементарными дупликатными генами. Если принять расщепление 21:43, то признак обусловлен одним основным доминантным геном и двумя комплементарными рецессивными генамиингибиторами. Аналогичную генетическую природу устойчивости к септориозу имеет и сорт Cotipora.

В комбинации скрещивания сорта Harvest Queen с сортом Иволга соотношение устойчивых и восприимчивых растений в F, соответствовало схеме расщепления 21:43. Таким образом, в данном случае взаимодействуют один основной и два комплементарных гена-ингибитора устойчивости к септориозу. Однако процент устойчивых растений, выщепившихся в F, гибридов от скрещивания сорта Harvest Queen с сортом Chinese Spring (56%) был значительно выше, чем при скрещивании его с сортом Иволга (36%). Схема расщепления соответствовала расщеплению 9:7 (признак устойчивости обословливается взаимодействием двух доминантных комплементарных генов). Ранее было установлено, что сорт Chinese Spring имеет два частично-доминантных комплементарных гена устойчивости к септориозу, один из которых локализован на хромосоме 3A, а другой – на 2A [8]. Nicholson с соавторами [10] при исследовании хромосомнозамещенных линий указывали на возможное наличие в геноме этого сорта факторов частичной устойчивости также на хромосомах 2B и 2D. Не исключено, что дополнительное выщепление гибридных растений, резистентных к септориозу, у рассматриваемой гибридной комбинации может быть обусловлено присутствием у них и генов устойчивости восприимчивого родителя. Так, например, описаны случаи выщепления в F_2 резистентных к S. nodorum растений в гибридных комбинациях, где ни один из

родителей не был устойчив, за счет аккумуляции у них генов исходных форм (трансгресивное расщепление) [5].

Анализ F_2 с участием сортов Neuzuchtung и Redhart показал соответствие теоретически ожидаемым расщеплениям 27:37 (три комплементарных гена устойчивости) и 25:39 (один основной ген и два гена-модификатора: ингибитор и усилитель). Причем, такие расщепления были отмечены при скрещивании с обоими восприимчивыми сортами. Следовательно, в резистентности этих сортов участвуют три гена.

Наследование признака устойчивости у сортов Coker 68-8, Disponent, HC, Moro, Oenus, Wiehenstephan 625/65, Заря и образца РІ 525450 при скрещивании с сортом Иволга обусловлено четырьмя генами. В каж-

дом случае экспериментально полученное расщепление соответствовало нескольким схемам теоретически ожидаемых частот. Однако можно сделать общий вывод о том, что у данных сортов проявление признака обусловлено взаимодействием одного основного гена резистентности и нескольких генов-модификаторов (ингибиторных, антиингибиторных, комплементарных).

Схема расщепления по устойчивости к септориозу гибридов F_2 , полученных с участием сорта Coker 47-27, соответствует 7:9, что свидетельствует о контроле признака двумя рецессивными генами (двойной рецессивный эпистаз) (табл. 2). Такая же генетическая природа резистентности обнаружена и у сорта Fiume при скрещивании его с сортом Иволга.

Таблица 2 Расщепление по устойчивости к изоляту №9 Мн возбудителя септориоза в F_2 гибридов, полученных с участием сортов мягкой пшеницы, являющихся эффективными донорами септориозоустойчивости

Комбинация скрещивания	Проанализир	овано растений	Схема	2.2
комоинация скрещивания	всего	% устойчивых	расщепления	χ^2
			7:9	1,20
Chinese Spring × Coker 47-27	279	40,50	27:37	0,33
			25:39	0,24
			7:9	2,47
Иволга × Coker 47-27	303	39,27	27:37	1,05
ribolii a ^ Cokei 4/-2/	303	39,27	25:39	0,01
			19:45	0,17
			7:9	1,31
Иволга × Fiume	299	40,47	27:37	0,36
			25:39	0,25
	188	27,66	1:3	0,71
Иволга × Burgas 2			15:49	1,87
PIBOJII a ^ Bulgas 2			21:43	2,26
			19:45	0,37
		26,89	1:3	0,58
Иволга × Jamhill	305		15:49	2,02
			19:45	1,15
		ļ	7:9	2,00
Иволга × Flex	145	37,93	21:43	1,72
PIBOJII a ~ I ICA	143	31,73	27:37	1,08
			25:39	0,08
Иволга × Hand	253	47,04	7:9	1,11
TIBOM a ·· Hand	233	77,07	27:37	2,44
Hanna V Cara	514	7.50	1:15	1,57
Иволга × Sage	514	7,59	15:241	2,78

Анализ наследования устойчивости к септориозу у сортов Burgas 2 и Jamhill при их гибридизации с сортом Иволга с выявил моногенный рецессивный контроль признака (схема расщепления соответствует 1:3) (табл. 2).

Расщепление по признаку резистентности в F_2 , полученном от скрещивания сорта Иволга с сортами Flex и Hand, соответствует диген-

ной схеме 7:9 (двойной рецессивный эпистаз).

При гибридизации сортов Иволга и Sage обнаружили расщепление 1:15. Это свидетельствует о полимерном взаимодействии двух генов. Таким образом, проявление признака устойчивости у сорта Sage обусловлено двумя рецессивными генами, действующими аддитивно.

Заключение

Изучен генетический контроль проростковой устойчивости к Septoria nodorum Berk. у 18 озимых и 8 яровых сортов мягкой пшеницы. Этот признак обычно имеет сложную генетическую природу. Тем не менее, некоторые исследователи выявляли сортообразцы с единичными главными генами резистентности. Такие формы оказываются эффективными донорами септориозоустойчивости для использования в селекции, так как при скрещивании с ними признак легко передается потомству. Анализ расщепления в F₂

по резистентности к высоко агрессивному изоляту возбудителя септориоза показал, что сорта Burgas 2 и Jamhill несут по одному рецессивному гену, а Flex, Hand, Sage, Coker 47-27, Fiume – по два рецессивных гена устойчивости. Остальные сорта обладают 3-4 генами резистентности. Таким образом, 7 из 26 исследованных сортов могут быть использованы в селекции в качестве эффективных доноров септориозоустойчивости для защиты растений мягкой пшеницы от болезни на ранних стадиях развития растений.

Список использованных источников

- 1. Пыжикова, Г.В. Для снижения вредоносности септориоза / Г.В. Пыжикова, Г.Ю. Тушинский // Защита растений. 1985. N9. С. 15—16.
- 2. Санин, С.С. Контроль болезней сельско-хозяйственных растений важнейший фактор интенсификации растениеводства / С.С. Санин // Вестник защиты растений. 2010.- N = 1.- C.3-13.
- 3. Grib, S.I. Wheat and triticale *Septoria* in Belarus / S.I. Grib, G.V. Budevich, S.A. Baturo // Hod. Rosl. Aklim Nasien. 1994. Vol. 38, N3/4. P. 69–71.
- 4. Коптик, И.К. Методы и результаты селекции озимой пшеницы в Белоруссии / И.К.Коптик//Теоретические основы селекции зерновых культур на продуктивность. Минск: Наука и техника, 1987. С. 239—248.
- 5. Laubscher, F.X. Heritable resistance of wheat varieties to glume blotch (*Septoria nodo-rum* Berk.) / F.X. Laubscher, B. von Wechmar, D. van Schalkwyk // Phytopathology. 1966. Vol. 56, N3. P. 260–264.

- 6. Frecha, J.H. The inheritance of resistance to Septoria nodorum in wheat / J.H. Frecha // Bol. Genet. Inst. Fitotec. Castelar. 1973. N8. P. 29–30.
- 7. Wong, L.S.W. Genetic control of seedling resistance to *Leptosphaeria nodorum* in wheat / L.S.W. Wong, G.R. Hughes // Proc. 3rd Int. Workshop: Septoria Diseases of Cereals, Zurich, Switzerland (July 4-7, 1989). 1989. P. 136–138.
- 8. Ma, H. Genetic studies of resistance to *Septoria nodorum* blotch in hexaploid wheat / H. Ma, G.R. Hughes // Hod. Rosl. Aklim. Nasien. 1994. Vol.38, N3/4. P. 209–212.
- 9. Лупей, А.Ю. Влияние плазмона на наследование устойчивости к *Septoria nodo-rum* Berk. у мягкой пшеницы / А.Ю. Лупей, Е.А. Волуевич, А.А. Булойчик // Цитология и генетика. 2000. Т. 34, №3. С. 15–20.
- 10. Nicholson, P. Chromosomal location of resistance to *Septoria nodorum* in a synthetic hexaploid wheat determined by the study of chromosomal substitution lines in 'Chinese Spring' wheat / P. Nicholson, H.N. Rezanoor, A.J. Worland // Plant Breed. 1993. Vol. 111, N3. P. 177–184.

Дата поступления статьи 28 октября 2011 г.

П.М. Морозик¹, И.Б. Моссэ¹, М.Д. Амельянович¹, Э.В. Руденко², В. Алекна³, М. Тамулайтене³

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ОСТЕОПОРОЗУ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27 ²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» Республика Беларусь, 22013, г.Минск, ул.П.Бровки, 3, корп. 3 ³ГНИИ «Центр инновационной медицины» Литовская Республика, LT-01102, Вильнюс, ул. Жигиманту, 9

Введение

Проект «Геном человека» определил бурное развитие и активное внедрение в медицинскую практику молекулярной медицины представления о существовании «генов предрасположенности» – генов, мутантные аллели которых совместимы с рождением и жизнью в постнатальном периоде, но при определенных неблагоприятных условиях могут способствовать развитию того или иного заболевания [1]. Такие заболевания называют мультифакториальными (МФЗ).

Развитие МФЗ (сахарный диабет, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, бронхиальная астма, остеопороз, эндометриоз, некоторые психические и онкологические заболевания) в значительной мере зависит от провоцирующего действия неблагоприятных факторов внешней среды, специфичных для конкретного заболевания.

Данный обзор посвящен молекулярногенетической диагностике предрасположенности к остеопорозу (одного из частых МФЗ) и особенностям аллельного полиморфизма генов метаболизма костной ткани.

Согласно определению Всемирной организации здравоохранения, под остеопорозом понимают системное заболевание скелета, характеризующееся снижением костной массы и микроархитектурными повреждениями костной ткани, которые ведут к увеличению хрупкости кости и повышению риска переломов [2]. Заболевание поражает все возрастные группы людей, характерно для мужчин и женщин, людей различных расовых групп. Наиболее часто остеопороз обнаруживается в пожилом и старческом возрасте.

Остеопороз, по данным ВОЗ, вышел по зна-

чимости на четвертое место среди неинфекционных заболеваний после сердечно-сосудистой и онкологической патологии, а также диабета.

Интерес к остеопорозу как важной медицинской и социальной проблеме очень высок. Это связано, прежде всего, с тем, что в развитых странах все большее внимание уделяется людям пожилого возраста, продолжительность жизни которых увеличивается, а активная созидательная деятельность сохраняется достаточно долго. Широкая распространенность, тяжесть исходов, особенно при переломах шейки бедра или позвонков и потеря способности к самообслуживанию определяют высокую социальную значимость данного заболевания.

Костная ткань постоянно обновляется, и каждые 10 лет старая заменяется новой. У детей и подростков образование новой костной ткани происходит быстрее, чем резорбция, и ее плотность увеличивается, достигая максимума к 18 годам. Затем наступает равновесие — оба процесса идут с одинаковой скоростью. Примерно к 40 годам начинается возрастное истончение костей, и резорбция постепенно начинает преобладать над увеличением минеральной плотности кости [3].

Вероятность развития остеопороза у женщин гораздо больше, чем у мужчин: на их долю приходится 80% случаев этого заболевания. С возрастом женщины лишаются одного из важных «протекторов» костной ткани — эстрогенов, и с наступлением менопаузы скорость резорбции у них резко возрастает. Рассчитано, что в среднем 40% женщин постменопаузального периода переносят, по крайней мере, один перелом вследствие остеопороза [4].

Мультифакториальная природа остеопороза

Популяционные вариации остеопороза связаны с особенностями взаимодействия генотипа и окружающей среды. В редких случаях остеопороз наследуется как моногенное заболевание — иногда его трудно отличить от мягких форм несовершенного остеогенеза, обусловленного доминантными мутациями в генах коллагена I типа — *COL1A1* и *COL1A2*. Поэтому неудивительно, что около 2% таких мутаций ассоциированы с остеопорозом.

На развитие остеопороза влияет образ жизни человека — физическая активность, питание, вредные привычки (курение, злоупотребление алкоголем), медикаментозные препараты, а также сопутствующие заболевания. В пользу мультифакториальной природы остеопороза также свидетельствуют возрастные, половые, расовые и географические различия в частоте и течении заболевания.

Учитывая вышеприведенные факты, определение молекулярно-генетических причин остеопороза является достаточно актуальной задачей.

Основное направление исследований в изучении генетики остеопороза – это изучение формирования пика костной массы, ее наследования, потери с возрастом, семейной предрасположенности к переломам, метаболизма кости. Исследование роли генетических факторов важно для детерминации фенотипических характеристик популяции и выявления их роли в развитии остеопороза. Существует несколько подходов для оценки вклада того или иного гена-кандидата в патогенез остеопороза. Один из них состоит в определении степени корреляции между аллельным полиморфизмом гена-кандидата и факторами, провоцирующими развитие болезни (популяционно-ассоциативная модель). С этой целью проводится сравнение частот аллелей предполагаемых генов-кандидатов у больных остеопорозом с таковыми у лиц, не имеющих данного заболевания и, соответственно, сохраняющих нормальную минеральную плотность костной ткани (МПК).

Костная масса, безусловно, относится к одному из генетически модулируемых параметров. В исследовании [5] было показано, что у сына пациента-мужчины с МПК ниже нормы риск развития остеопороза повышен

в 4 раза, а у дочери пациента-женщины с пониженной МПК риск возрастает в 5 раз. В настоящее время четко доказано, что низкий пик костной массы можно рассматривать как предиктор развития остеопороза и переломов, ассоциированных с остеопорозом [6].

Специфичность формирования пика костной массы в зависимости от пола представлена в работе [7]. Проведенные исследования подтвердили тот факт, что роль генетических факторов несомненна, но наряду с генетическими необходимо учитывать и средовые факторы [8]. Толчком для нарушений формирования пика костной массы и развития остеопороза может явиться целый ряд заболеваний, таких как мальабсорбция, почечная дистрофия, респираторные заболевания, ревматоидный артрит, иммунологические нарушения, заболевания крови, а также иммобилизация и др.

Высокий вклад наследственности в характеристики костной ткани проявляется на восьмой декаде жизни [9]. При этом он варьирует в зависимости от пола [10].

Предрасположенность к переломам костей также генетически предетерминирована [11]. Например, в исследовании [12] было показано, что риск перелома шейки бедра повышен в 2 раза независимо от МПК, если у родителей был перелом бедра. Вклад наследственности в перелом запястья составляет от 23 до 54% и также не зависит от МПК [13].

Семейный и наследственный характер переломов независимо от МПК свидетельствует о том, что генетические факторы оказывают влияние на риск переломов механизмами, отличными от тех, которые контролируют плотность костной ткани.

К наследственным факторам риска остеопороза относят особенности телосложения пациентов, унаследованные от родителей. Доказано, что лица низкого роста и хрупкого телосложения могут быть в группе риска заболевания [14]. Анатомические особенности строения костей также имеют генетическую предрасположенность. Некоторые варианты строения костей и их конфигурации можно рассматривать как факторы риска переломов (в частности, длина шейки бедренной кости и самой кости) [15].

Достоверную информацию об особенностях

наследования костной массы и МПК можно получить в исследованиях близнецов. Это удобная генетическая модель, так как монозиготные близнецы имеют 100% общих аллелей, а дизиготные только 50% общих аллелей. Доказано, что у монозиготных близнецов меньше различий в МПК, чем у дизиготных [16].

Одной из главных причин, определяющих потерю костной массы у женщин, является дефицит эстрогенов в период менопаузы. Проведенные исследования показали, что возраст возникновения менопаузы также генетически детерминирован [17].

Установление факта генетической предрасположенности остеопороза по показателям МПК и костной массы активизировало проведение исследований по идентификации генов-кандидатов, вовлеченных в процесс развития и формирования костной ткани. При этом основной проблемой при выборе кандидатуры гена является большое количество и разновидность белков, вовлеченных в биологию скелета и остеогенез, и все кодирующие их гены могут являться потенциальными кандидатами. В связи с этим, число кандидатур генов достаточно велико и постоянно увеличивается с введением новых технологий анализа экспрессии гена. Полиморфные аллели генов-кандидатов лишь в том случае считаются генетическими факторами риска, если их частоты в выборках больных достоверно превышают контрольные уровни.

В настоящее время накоплен обширный материал о генетической детерминированности минеральной плотности костной ткани. Оценка наследуемости МПК колеблется в зависимости от особенностей исследуемых выборок и достигает достаточно высоких величин — от 45% до 80%, то есть получены убедительные доказательства генетической детерминированности остеопороза. Идентифицировано более 100 генов-кандидатов, которые связаны с МПК и риском развития остеопороза [18]. В данном обзоре будут проанализированы основные из них, вносящие наибольший вклад в развитие остеопороза (табл. 1).

Таблица 1 Полиморфизмы генов, оказывающих наибольшее влияние на развитие остеопороза

Ген	Полиморфизм	Reference SNP#	Благоприятный аллель	Аллель риска
	BsmI	rs1544410	b	В
	ApaI	rs7975232	a	A
VDR	TaqI	rs731236	Т	t
	FokI	rs2228570	F	f
	Cdx2	rs11568820	G	A
	PvuII	rs2234693	Т	С
ER	XbaI	rs9340799	A	G
	$(TA)_n$		>15	<15
COL1A1	c.104 - 441G>T	rs1800012	G	T
LCT	c 13910C>T	rs4988235	T	С

Ген рецепторов витамина *D (VDR)*

В настоящее время из множества изученных генов-кандидатов, детерминирующих развитие остеопороза, ген *VDR* изучен лучше всего.

Витамин D эндокринной системы оказывает плейотропный эффект на иммунную модуляцию, регуляцию пролиферации и дифференцировки клеток, скелетный метаболизм. Длительный дефицит витамина D3 у детей приводит к развитию рахита, а у взрослых — к остеомаляции. Ген VDR является центральным регулятором в эндо-

кринной системе и выступает как ген-кандидат, обусловливающий особенности роста человека.

Ген рецептора витамина D характеризуется наличием полиморфизма в экзоне 9. Выявлено, что последовательность гена *VDR* является полиморфной у различных лиц. В нем известны 5 полиморфизмов длины рестрикционных фрагментов — *Bsm I, Apa I, Taq I, Fok I* и *Cdx2*, из которых маркер *Bsm I* имеет наибольшую информативность.

Полиморфизм BsmI содержит сайт рестрикции, обозначаемый как аллель b. В случае отсутствия такого сайта аллель обозначается как В. До 16% представителей белой расы являются гомозиготами по функционально неполноценному аллелю этого гена (B/B) и относятся к группе риска развития остеопороза и остеопоротических переломов.

Было показано, что у людей с генотипом B/B риск возникновения переломов тел позвонков появляется на 11 лет раньше, чем у лиц с генотипом b/b. В группе B/B риск переломов шейки бедра в четыре раза превышает аналогичный риск у людей с нормальным генотипом [19].

При исследовании близнецов различного возраста было установлено, что пары монозиготных близнецов с совпадающим генотипом VDR имеют меньшие различия по МПК, чем дизиготные близнецы [19]. При анализе групп близнецов было показано, что генотип b/b ассоциирован с наиболее высокой МПК, а значение МПК у гетерозигот B/b приблизительно соответствует среднему значению, наблюдаемому в группах b/b и B/B, т.е. имеет место эффект дозы гена.

При сравнительном анализе результатов 16 исследований взаимосвязи МПК и частотой полиморфизма *BsmI* было показано, что обладатели *B/B*-генотипа имеют в среднем на 1,5-2,5% более низкую МПК по сравнению с носителями *b/b* генотипа [20].

Р. Garnero и соавт. [21] изучали связь полиморфизмов гена рецептора витамина D с возникновением переломов вертебральной и невертебральной локализации. Было исследовано 589 женщин после 60 лет (в постменопаузном периоде). Была выявлена ассоциация между увеличением частоты аллеля B у женщин и частотой переломов. Относительный риск подобных пере-

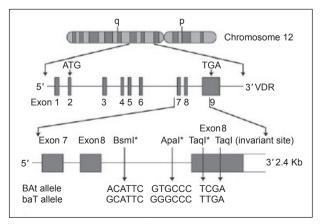
ломов у женщин с генотипом B/b в 1,5 раза, а у женщин с генотипом B/B — в 2,1 раза больше по сравнению с женщинами-носителями генотипа b/b. Женщины в исследуемых группах не отличались по демографическим признакам, конституции, индивидуальному и семейному анамнезу переломов или уровню усвоения кальция. Уровень плотности костной ткани в позвоночном столбе, бедренной кости, лучевой кости, а также снижение плотности ткани в лучевой кости не влияли на ассоциацию генотипа с возникновением переломов.

Полиморфизмы Apal и Taql являются другими распространенными вариантами гена VDR (A и a, T и t аллели, соответственно). Многочисленными исследованиями было показано, что более высокие значения минеральной плотности костной ткани ассоциированы с TTbbaa-генотипом [22].

При обследовании препубертатных девочек у носителей генотипа *A/A* полиморфизма *ApaI* и генотипа *B/B* полиморфизма *BsmI* наблюдался низкий уровень МПК по сравнению с носителями *a/a* и *b/b* генотипов [23]. В исследовании [24] было показано, что максимальная МПК также коррелирует с полиморфизмами *ApaI*, *BsmI* и *TaqI*.

В исследовании [25] при анализе полиморфизма TaqI гена VDR было показано, что у носителей генотипа T/T МПК была выше по сравнению с носителями других генотипов.

Полиморфизмы *BsmI*, *ApaI* и *TaqI* локализованы в 3'-регуляторной области гена *VDR*, поэтому их часто выделяют в один гаплотип. Участок 3'UTR гена *VDR* вовлечен в регуляцию экспрессии, в первую очередь, за счет регуляции стабильности мРНК. Часто встречающимися и анализируемыми гаплотипами являются 2 варианта: *baT* и *BAt* (рис. 1) [19].



Puc. 1. Локализация полиморфизмов BsmI, ApaI и TaqI гена VDR

Полиморфизм FokI. Установлено, что у женщин с генотипом f/f полиморфизма FokI гена VDR на 12,8% чаще наблюдались более низкие значения МПК, чем у женщин с генотипом F/F. При сравнении пременопаузальных белых женщин с FF- и ff-генотипами оказалось, что у носительниц генотипа f/f частота низких значений минеральной плотности костной ткани всего тела больше на 4,3%, а шейки бедра — на 12,1%, чем у женщин с генотипом F/F [26].

Полиморфизм Cdx2. В последнее время появился ряд работ, посвященных изучению полиморфизма, результатом которого является замена $A \rightarrow G$ в положении -3731 от сайта инициации транскрипции гена VDR. Функциональный анализ полиморфной области провели на модельной линии клеток кишечника. Было показано, что наличие полиморфизма Cdx2 способствует активации транскрипции гена VDR [27]. По результатам проведенной работы авторы предположили, что Cdx2 играет важную роль в регуляции гена VDR.

В исследовании [27] изучали ассоциацию полиморфизма *Cdx2* с МПК у 261 японских

женщин. Было показано, что при низком потреблении кальция МПК в поясничном отделе позвоночника у пациенток с A/A генотипом значительно выше, чем у женщин с G/G генотипом. При более высоком потреблении кальция у женщин с А/А генотипом МПК шейки бедра была ниже по сравнению с G/G и G/Aгенотипами [28]. Таким образом, женщины с генотипом А/А имели МПК выше при низком уровне потребления кальция, тогда как при более высоком потреблении кальция, ситуация была полностью противоположной. Данный факт полностью совместим с теорией Эйсмана, постулирующей, что взаимосвязь между экологическим фактором (например, питанием) и МПК различаются для каждого генотипа таким образом, что при низком уровне воздействия экологического фактора преимущество имеет один генотип, а при более высоком уровне – другой [29]. По результатам исследований было показано, что наличие полиморфизма Cdx2на 20% снижает риск перелома позвоночника независимо от пола человека [30].

Ген коллагена I типа (COLIAI)

Коллаген I типа является основным белком костной ткани, формирующим ее органический матрикс. Ген, кодирующий этот белок, может быть рассмотрен как ген-кандидат в патогенезе остеопороза. Коллаген состоит из трех белковых нитей, переплетенных между собой. Основной коллаген состоит из двух нитей коллагена альфа 1 и одной нити коллагена альфа 2. Ген *COL1A1* кодирует основной компонент коллагена 1-го типа. В настоящее время известно 9 типов молекул коллагена, волокна которых кодируются минимум 17 генами. Волокнистый коллаген является основным компонентом хрящевой ткани и входит в состав большинства других соединительных тканей. Мутации в данном гене ассоциированы с развитием незавершенного остеогенеза, синдромом Элерса-Данло и идиопатическим (спонтанным) остеопорозом.

В 1996 году Grant и соавт. впервые описал полиморфизм G > T гена COL1A1 в сайте связывания с транскрипционным фактором SP1 [31]. Полиморфизм располагается в первом интроне гена и значимо связан с остеопоротическими переломами. Исследование 299 британских

женщин показало ассоциацию полиморфизма со снижением плотности костной ткани (ПКТ) и увеличением числа остеопоротических переломов. Генотипы *G/T* и *T/T* чаще встречались у пациентов с тяжелыми формами остеопороза и вертебральными переломами (54%), по сравнению с группой контроля (27%). Относительный риск вертебральных переломов у носителей мутантного аллеля Т составил 2,97. Позже данные результаты были подтверждены Uitterlinden и соавт. на группе 1778 женщин в постменопаузальном периоде [32].

Исследования, проведенные на образцах крови датских мужчин и женщин с целью определения отношения между вариантами гена *COL1A1*, плотностью костей и биохимическими маркерами ремоделирования костей, показали, что генотип *T/T* является независимым маркером для предсказания риска остеопоротических переломов как у женщин, так и у мужчин. Следовательно, его определение может иметь огромное клиническое значение в идентификации индивидуумов с повышенным риском развития остеопороза независимо от пола [33].

В исследовании [34] было показано, что у лиц с генотипом T/T полиморфизма гена COL1A1 риск переломов повышен на 40% по сравнению с лицами с генотипом G/G.

При исследовании полиморфизма G/T гена COL1A1 показано, что у носителей аллеля T наблюдается дисбаланс белков коллагена 1 и 2 типа, приводящий к снижению роста кости в длину, редукции костной массы и нарушению ее минерализации [35]. Данные исследования де-

монстрируют, что полиморфизм в гене COLIA1 ассоциирован со снижением МПК и может предрасполагать к случайным переломам у женщин в постменопаузальный период. При проведении ретроспективного мета-анализа по результатам опубликованных данных, проведенного в работе [36] было показано, что наличие T аллелей полиморфизма Sp1 связано со снижением МПК в поясничном отделе, шейке бедренной кости и с переломами тел позвонков.

Ген рецептора эстрогена (ER)

Эстрогены играют важную роль в регуляции костного гомеостаза и поддержании МПК. Их потеря с возрастом приводит к выраженным нарушениям структуры как компактной, так и губчатой кости. Эстрогены являются неотъемлемым звеном в комплексе факторов, влияющих на закрытие зон роста костей у молодых женщин [37] и способствуют сохранению костной массы у зрелых женщин [38]. В связи с тем, что остеобласты имеют рецепторы к этим генам, выбор для анализа взаимосвязи МПК и гена рецепторов эстрогенов (*ER*) не случаен.

Эффекты эстрогенов на структуры скелета опосредуются через связывание рецепторами двух типов, кодируемых генами ER- α и ER- β . Оба рецептора в костной ткани экспрессируются в большом количестве [39].

Полиморфизмы PvuII, XbaI в интроне 1 и TA-повторы в промотерной области гена ER- α изучались наиболее активно.

Считается, что полиморфизм *TA*-повторов оказывает эффект на МПК путем изменения продукции и стабильности мРНК, в то время как функциональное значение полиморфизмов *PvuII* и *XbaI* до конца не выяснено [40].

В исследовании [41] анализировали взаимосвязь между PvuII и XbaI полиморфизмами гена ER- α и МПК у 2230 40-79-летних жителей Японии. У женщин в возрасте старше 60 лет наблюдалась достоверная корреляция между этими полиморфизмами и МПК шейки бедра.

В исследовании [42] наблюдалась взаимосвязь между МПК позвоночника и генотипом полиморфизма XbaI.

Vann Meurs и соавт. [43] изучали взаимосвязь всех трех полиморфизмов с МПК позвоночника и частотой переломов среди 2042 пожилых голландцев. Среди женщин наблюдалась статистически достоверная зависимость между частотой гомозигот CG/CG и низким числом TA-повторов и пониженной МПК поясничного отдела позвоночника по сравнению с гомозиготными носителями аллелей дикого типа. Более того, частота переломов была выше у носителей полиморфизмов PvuII и XbaI (OR = 2,2) в сочетании с низким числом TA-повторов (OR = 2,0) гена ER- α .

Было показано, что новый полиморфизм rs1801132 гена ER- α связан с частотой остеопоротических переломов в группе 6752 белокожих женщин [44].

Изучение влияния полиморфизмов генов ER- α и ER- β на риск развития остеопороза нуждается в дальнейших подтверждающих исследованиях.

В целом, как и для гена *VDR*, индивидуальный вклад гена *ER* в развитие остеопороза считается подтвержденным и не вызывает сомнений. Проводимые в настоящее время исследования направлены на установление молекулярных механизмов вклада этого гена в предрасположенность к остеопорозу и возможности проведения заместительной терапии.

Ген лактазы (*LCT*)

Ген LCT кодирует аминокислотную последовательность фермента лактазы. Этот фермент вырабатывается в тонком кишечнике и уча-

ствует в расщеплении молочного сахара – лактозы. Лактаза обычно присутствует у детей, во взрослом состоянии у людей с определенным

генотипом фермент перестает вырабатываться. Употребление молочных продуктов в этом случае приводит к кишечным расстройствам вследствие непереносимости лактозы, сопровождающимися такими симптомами, как газообразование, отрыжка, спастические боли в животе и диарея. Данный вид метаболического нарушения встречается в 10-18% популяции в Германии, 20-25% в Австрии и 20-40% в Швейцарии.

Как правило, после исключения из питания молока и других продуктов, содержащих лактозу, у большинства лиц с лактазной недостаточностью состояние здоровья нормализуется в течение 2-3 недель.

Сознательное или неосознанное избегание взрослыми употребления молока и молочных продуктов, являющихся важным источником кальция, может приводить к развитию дефицита кальция. Для женщин, находящихся в постменопаузе, дефицит кальция крайне неблагоприятен, так как обусловливает развитие остеопороза.

Описанные выше симптомы встречаются у людей с генетическим вариантом C/C полиморфизма -13910 T>C гена лактазы LCT. Люди с генетической предрасположенностью к непереносимости лактозы чаще подвержены риску снижения костной массы, равно как и риску невертебральных переломов. Такая взаимосвязь, по-видимому, обусловлена изменением в метаболизме кальция при развитии описанной недостаточности. При этом нормальный вариант полиморфизма С связан со снижением синтеза лактазы во взрослом состоянии, а мутантный вариант T – с сохранением у взрослых высокой лактазной активности. Таким образом, гомозиготные носители варианта C не способны к усвоению лактозы (уровень синтеза мРНК гена лактазы у таких пациентов снижен до 2-22%), в то время как гомозиготные носители варианта Тлегко усваивают лактозу и хорошо переносят молочные продукты.

В исследовании [45] была охарактеризована функциональная роль полиморфизма LCT -13910 T>C в регуляции транскрипции гена LCT. В результате эксперимента было показано 2,2-кратное снижение активности гена при наличии варианта -13910C.

В своем исследовании Obermayer-Pietsch и соавт. [46] продемонстрировали, что полиморфизм $LCT-13910\ T>C$ влияет на предрасположенность к переломам у женщин в постменопаузальный период опосредованно через снижение поступления кальция, вследствие уменьшения толерантности к лактозе. В ходе исследования был определен генотип по полиморфизму -13910 T>C гена LCT у 258 женщин в постменопаузальном периоде. Изучалось влияние генотипа на наличие непереносимости молока, абсорбцию кальция в кишечнике, плотность костной ткани и невертебральных переломов. Было обнаружено, что 24% женшин от общего числа имеют генотип C/C и наследственную непереносимость лактозы. Статистический анализ показал значимое снижение (p = 0.04) плотности костной ткани в бедренной кости (на 7%) для генотипа C/C и позвоночнике (11%) при наличии генотипа С/С и T/C. Кроме того, была найдена достоверная ассоциация переломов с C/C генотипом (p =0.001). Захват кальция, содержащегося в молоке, был снижен на 55% (p = 0.004), субъективное отвращение к молоку испытывало 16.6% (p = 0.01) женщин с генотипом С/С. Однако не было выявлено влияние полиморфизма на общий захват кальция, не связанный с потреблением молока.

Таким образом, определение генотипа полиморфизма -13910 T>C гена LCT является значимым при определении индивидуального риска остеопороза из-за сниженного усвоения лактозы у женщин в постменопаузальный период.

Заключение

Проведенный анализ литературных данных свидетельствует о том, что наибольший вклад в развитие остеопороза вносят гены *VDR*, *COL1A1*, *ER* и *LCT*. В настоящее время врачам различных специальностей для успешной деятельности необходимо иметь более полное представление о влиянии полиморфизмов ге-

нов человека на развитие патологических процессов. Такие исследования важны для более рациональной организации системы профилактики и лечения заболевания еще на ранних, досимптомных стадиях его развития.

При выявлении у пациента вышеперечисленных полиморфизмов ему следует уделять

серьезное внимание диете, балансу витамина D и кальция, оздоровительным программам с применением рациональных режимов естественной и аппаратной инсоляции.

Выявление групп риска позволит проводить своевременные профилактические мероприятия, а также повысить эффективность терапии, избежать осложнений, снизить инвалидизацию и смертность таких пациентов, а также сократить расходы на их лечение.

В лаборатории генетики человека Института генетики и цитологии НАН Беларуси совместно с Городским центром профилактики остеопороза (г. Минск) и Национальным центром

остеопороза (г. Вильнюс) начаты исследования по проекту «Взаимосвязь генетических, клинических и биохимических маркеров костного ремоделирования при тяжелом постменопаузальном остеопорозе». В рамках данного проекта проводится анализ частоты гомозиготных и гетерозиготных носителей полиморфизмов генов VDR, COL1A1 и LCT, а также показателей МПК в группе пациентов с тяжелым постменопаузальным остеопорозом в сравнении с контрольной группой населения Беларуси и Литвы.

Материалы подготовлены при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б11ЛИТ-017).

Список использованных источников

- 1. Баранов, В.С., Иващенко, Т.Э., Баранова, Е.В., Асеев, М.В., Глотов, А.С., Глотов, О.С., Беспалова, О.Н., Демин Г.С., Москаленко М.В., Швед, Н.Ю. Генетический паспорт основа индивидуальной и предиктивной медицины / В.С. Баранов [и др.]; под ред. В.С. Баранова. Санкт-Петербург: Н-Л, 2009. 527 с.
- 2. Остеопороз у детей. Учебное пособие для практических врачей / Н.А. Коровина [и др.]; Москва: Каф. педиатрии Росс. МАПО МЗ РФ. 2005. 50 с.
- 3. Плюскевич, В. Значение профилактики при остеопорозе / В. Плюскевич, Р. Гавлик // Новости фармации и медицины. 1995. №3. С. 10—12.
- 4. Audí, L. Genetic determinants of bone mass / L. Audí, M. García-Ramírez, A. Carrascosa // Horm. Res. 1999. Vol. 51, №3. P. 105–123.
- 5. Environmental and genetic factors affecting bone mass. Similarity of bone density among members of healthy families / P. Jouanny [et al.] // Arthritis Rheum. 1995. Vol. 38. P. 61–67.
- 6. Heaney, R.P. Some questions about «Epidemiologic association between dietary calcium intake and blood pressure: a meta-analysis of published data» / R.P. Heaney // Am. J. Epidemiol. 1997. Vol. 145, №9. P. 858–859.
- 7. Orwoll, E.S. Gender specificity in the genetic determinants of peak bone mass / E.S. Orwoll, J.K. Belknap, R.F. Klein // J. Bone Miner. Res. 2001. Vol. 16, №11. P. 1962–1971.
- 8. Bone mineral density in mother-daughter pairs: relations to lifetime exercise, lifetime milk consumption, and calcium supplements /

- C.M. Ulrich [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. 1996. Vol. 63, №1. P. 72–79.
- 9. Determinants of hip axis length in women aged 10-89 years: a twin study / L. Flicker [et al.] // Bone. 1996. Vol. 18. P. 41–45.
- 10. Genetic and environmental determinants of bone mineral density in Mexican Americans: results from the San Antonio Family Osteoporosis Study / B.D. Mitchell [et al.] // Bone. 2003. Vol. 33. P. 839–846.
- 11. Genetic determination of Colles' fracture and differential bone mass in women with and without Colles' fracture / H.W. Deng [et al.] // J. Bone Miner. Res. 2000. Vol. 15. P. 1243–1252.
- 12. A family history of fracture and fracture risk: a meta-analysis / J.A. Kanis [et al.] // Bone. 2004. Vol. 35. P. 1029–1037.
- 13. Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD / T. Andrew [et al.] // J. Bone Miner. Res. 2005. Vol. 20. P. 67–74.
- 14. Франке, Ю. Остеопороз / Ю. Франке, Г. Рунге. Москва: Медицина. 1995. 300 с.
- 15. Linkage of a QTL contributing to normal variation in bone mineral density to chromosome 11q12-13 / D.L. Koller [et al.] // J. Bone Miner. Res. 1998. Vol. 33, №12. P. 1903–1908.
- 16. The contribution of genetic influences to measures of lower-extremity function in older male twins / D. Carmelli [et al.] // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2000. Vol. 55, №1. P. 49–53.
- 17. Snieder, H. Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of

- hysterectomy and age at menopause / H. Snieder, A.J. MacGregor, T.D. Spector // J. Clin. Endocrinol. Metab. − 1998. − Vol. 83, №6. − P. 1875–1880.
- 18. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update / X.H. Xu [et al.] // Endocr. Rev. -2010. Vol. 31, N04. P. 447–505.
- 19. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles / N.A. Morrison [et al.] // Nature. 1994. Vol. 367. P. 284–287.
- 20. Мякоткин, В.А. Генетика остеопороза / В.А. Мякоткин // Рос.конгресс по остеопорозу: научная программа и тезисы. Ярославль: Литера, 2003. С. 27—29.
- 21. Garnero, P. Bone marrow abnormalities on magnetic resonance imaging are associated with type II collagen degradation in knee osteoarthritis: a three-month longitudinal study / P. Garnero, C. Peterfy, S. Zaim, M. Schoenharting // Arthritis Rheum. − 2005. − Vol. 52, №9. − P. 2822–2829.
- 22. Gong, G. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms / G. Gong, H.S. Stern, S.C. Cheng // Osteoporosis Int. 1999. Vol. 9. P. 55–64.
- 23. Vitamin D-receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent / J. Sainz [et al.] // N. Engl. J. Med. 1997. Vol. 337, №2. P. 77–82.
- 24. Determinants of peak bone mass: clinical and genetic analyses in a young female Canadian cohort / L.A. Rubin [et al.] // J. Bone Miner. Res. − 1999. − Vol. 14, №4. − P. 633–643.
- 25. Genetic control of bone density and turnover: role of the collagen 1alpha1, estrogen receptor, and vitamin D receptor genes / M.A. Brown [et al.] // J. Bone Miner. Res. 2001. Vol. 16, №4. P. 758–764.
- 26. Ralston, S.H. The genetics of osteoporosis / S.H. Ralston // Bone. 1999. Vol. 25, №1. P. 85–86.
- 27. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene / H. Arai [et al.] // J. Bone Miner. Res. 2001. Vol. 16, №7. P. 1256–1264.
- 28. McDonald, C.F. Calcitriol does not prevent bone loss in patients with asthma receiving corticosteroid therapy: a double-blind placebo-controlled trial / C.F. McDonald, R.M. Zebaze, E. Seeman // Osteoporos Int. − 2006. − Vol. 17, №10. − P. 1546–1551.

- 29. Eisman, J.A. Genetics, calcium intake and osteoporosis / J.A. Eisman // Proc. Nutr. Soc. 1998. Vol. 57, №2. P. 187–193.
- 30. The Association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: A participant-level meta-analysis / A.G. Uitterlinden [et al.] // Ann. Intern. Med. 2006. Vol. 145. P. 255–264.
- 31. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene / S.F. Grant [et al.] // Nat. Genet. 1996. Vol. 14, №2. P. 203–205.
- 32. Relation of alleles of the collagen type Ialpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women / A.G. Uitterlinden [et al.] // N. Engl. J. Med. 1998. Vol. 338, №15. P. 1016–1021.
- 33. Langdahl, B.L. An Sp1 binding site polymorphism in the *COL1A1* gene predicts osteoporotic fractures in both men and women / B.L. Langdahl, S.H. Ralston, S.F. Grant, E.F. Eriksen // J. Bone Miner. Res. − 1998. − Vol. 13, №9. − P. 1384–1389.
- 34. GENOMOS Investigators. Large-scale evidence for the effect of the *COL1A1* Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study / S.H. Ralston [et al.] // PLoS Med. 2006. Vol. 3, №4. P. 90.
- 35. Association of *COLIA1 Sp1* alleles with defective bone nodule formation in vitro and abnormal bone mineralization *in vivo* / T.L. Stewart [et al.] // Calcif. Tissue Int. 2005. Vol. 77, №2. P. 113–118.
- 36. Mann, V. Meta-analysis of *COL1A1* Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture / V. Mann, S.H. Ralston // Bone. 2003. Vol. 32, №6. P. 711–717.
- 37. Pediatric endocrinology update: an overview. The essential roles of estrogens in pubertal growth, epiphyseal fusion and bone turnover: lessons from mutations in the genes for aromatase and the estrogen receptor / M.H. MacGillivray [et al.] // Horm. Res. 1998. Vol. 49, Suppl. 1. P. 2–8.
- 38. Lindsay, R. The role of estrogen in the prevention of osteoporosis / R. Lindsay // Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 1998. Vol. 27, №2. P. 399–409.

- 39. Bland, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone / R. Bland // Clin. Sci. (Lond). 2000. Vol. 98. P. 217–240.
- 40. Liu, Y.Z. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update / Y.Z. Liu, Y.J. Liu, R.R. Recker, H.W. Deng // J. Endocrinol. 2003. Vol. 177, №2. P. 147–196.
- 41. The skeletal response to estrogen is impaired in female but not in male steroid receptor coactivator (SRC)-1 knockout mice / U.I. Modder [et al.] // Bone 42:414–421. 2008. Vol. 42, №1. P. 414–421.
- 42. Anorganic bovine bone and a silicate-based synthetic bone activate different microRNAs / P. Annalisa [et al.] // J. Oral. Sci. 2008. Vol. 50. P. 301–307.

- 43. Titanium acts on osteoblast translational process / A. Palmieri [et al.] // J. Oral. Implantol. 2008. Vol. 34, №1. P. 190–195.
- 44. Genetic variation in candidate osteoporosis genes, bone mineral density, and fracture risk: the study of osteoporotic fractures / G.J. Tranah [et al.] // Calcif. Tissue Int. 2008. Vol. 83. P. 155–166.
- 45. Olds, L.C. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity *in vitro*: functional role as a cis regulatory element / L.C. Olds, E. Sibley // Hum. Mol. Genet. 2003. Vol. 12, №18. P. 2333–2340.
- 46. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures / B.M. Obermayer-Pietsch [etal.]//J.BoneMiner.Res.−2004.−Vol.19,№1.− P. 42–47.

Дата поступления статьи 14 ноября 2011 г.

М.И. Лесюк¹, О.Ю. Конева², Е.А. Ровба², А.М. Слуквин²

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ СТЕРЛЯДИ (ACIPENSER RUTHENUS L.)

¹ОАО «Рыбхоз «Полесье», Республика Беларусь, 225734, Брестская обл., Пинский р-н, п/о П. Загородский, д. Вяз ²ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Осетровые – это древняя группа хрящевых видов рыб, ценнейшая в пищевом отношении, которая на протяжении 350 млн. лет своей эволюции практически не подверглась крупным морфологическим изменениям [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Высокие цены на данный вид рыбной пищевой продукции, интенсификация промысла, браконьерство, усиление антропогенного пресса на среду обитания осетровых привели к тому, что большинство видов находятся под угрозой исчезновения и демонстрируют наиболее низкую численность за всю историю их изучения, а некоторые из них почти исчезли [2, 8, 9, 10]. Во всем мире значительные усилия и исследования фокусируются на возобновлении численности осетровых рыб, разрабатываются методы их искусственного воспроизводства, товарного выращивания, выполняются исследования и разрабатываются программы по сохранению и увеличению численности природных популяций, а также проводятся мероприятия по реинтродукции, исчезающих популяций осетровых в бывшие ареалы их обитания [1, 2, 3, 11, 12, 13, 14, 15].

В настоящее время в водотоках Беларуси остался единственный представитель осетровых — стерлядь (Acipenser ruthenus L.). Если в первой половине XX века в бассейне реки Днепр в пределах Беларуси стерлядь была довольно многочисленной промысловой рыбой, то в настоящее время вылавливается единичными экземплярами. С 1981 года стерлядь включена в Красную книгу Беларуси, категория I (CR) — популяция вида, имеющего очень низкую численность, или как вид, находящийся под угрозой исчезновения [8].

Дефицит товарной рыбной продукции осетровых на рынке Беларуси восполнялся импортом из Российской Федерации. С целью сокращения импорта осетровых и для расширения видового разнообразия выращиваемой отечественными рыбоводными хозяйствами товарной рыбной продукции, в 2000 г. на территорию Республики Беларусь была завезена стерлядь из волжского региона Российской Федерации (ГУДП «Конаковский завод товарного осетроводства») [3, 16]. Со временем в ряде хозяйств ОАО «Рыбхоз «Полесье», ОАО «Рыбхоз «Селец», ОАО «Рыбхоз «Волма» и др. были сформированы маточные стада стерляди, налажено ее искусственное воспроизводство, а также получение рыбопосадочного материала и товарной рыбы.

Возможность вселения выращиваемой стерляди в водотоки Беларуси наталкивалась на международные обязательства по сохранению биоразнообразия из-за существовавшей опасности нанесения вреда со стороны вселенца для местной малочисленной днепровской популяции стерляди, находящейся на грани исчезновения. Поэтому возникла необходимость в установлении происхождения завезенной популяции стерляди. По просьбе специалистов ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области в 2008-2009 гг. в рамках хозяйственного договора нами были выполнены идентификационные молекулярно-генетические исследования производителей стерляди с использованием микросателлитных маркеров. Из 240 особей маточного стада стерляди в 2008 г. было изучено 24 экз. (или 10% от численности маточного поголовья).

Задачей настоящей работы являлось продолжение начатых в 2008 г. молекулярногенетических исследований стерляди по проверке гипотезы ее днестровско-днепровского происхождения с использованием микросателлитного метода на увеличенной выборке маточного стада, сформированного в ОАО «Рыбхоз «Полесье».

В результате проведенных исследований было установлено, что завезенная из волжского региона стерлядь имеет днестровскоднепровское происхождение [16].

Материалы и методы

Материалом для исследования полиморфизма по микросателлитным локусам послужила выборка из 24-х особей производителей стерляди, взятых в 2009 г. в ОАО «Рыб-

хоз «Полесье» Пинского района Брестской области.

Количество изученных особей производителей стерляди приведено в табл. 1.

Таблица 1 Выборки производителей стерляди весной 2009 г.

№ п/п	Место отбора проб	Дата отбора проб	Число исследованных особей, шт.	Пол	Возраст особей
1	Маточный пруд №16	23.04.2009 г.	12	9	девятигодовик
2	Маточный пруд №16	23.04.2009 г.	12	8	
Итого			24	_	_

Для молекулярно-генетических исследований прижизненно отбирали и фиксировали в 96%-ом этаноле тканевые пробы плавников, затем проводили выделение из них ДНК. Образцы отмывали от спирта дистиллированной водой, после чего от каждого образца плавника отрезали небольшой участок ткани (3×3 мм) и помещали в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл. Затем к каждому образцу приливали 500 мкл лизирующего буфера (10 мМ Tris-HCl, pH=7,5; 10 мМ Na₂ЭДТА, pH=8,0; 50 мМ NaCl; 2% SDS), 30 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и 30 мкл 1М ДТТ. Образцы помещали в термостат на 18 часов при 37 °C.

Для очистки ДНК к лизату добавляли по 500 мкл фенол-хлороформной смеси, центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 12 минут, водную фазу (аккуратно, не задевая осадок) переносили в чистую пробирку (повторяли дважды). Для более полной очистки ДНК к супернатанту добавляли 500 мкл хлороформа, центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 12 минут, водную фазу переносили в чистую пробирку. Далее в целях уменьшения потерь ДНК продукта добавляли по 35 мкл 5 М NaCl.

ДНК осаждали охлажденным [до –20°C] 96%-ным этанолом, центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 12 мин. Избавлялись от надосадка. Осадок промывали в 1 мл 70% этанолом, центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 12 мин. Затем осадок высушивали при комнатной температуре и растворяли в 100 мкл ТЕ-буфера.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro UV/ Visible (Biochrom Ltd., Великобритания). Спектрофотометрический анализ степени загрязнения полученных препаратов ДНК белками, проведенный на основе соотношения коэфициентов поглощения A_{260}/A_{280} с учетом фоновой компенсации при 320 нм для введения поправки на буферные растворы с высоким поглощением, подтвердил высокую степень очистки полученных препаратов ДНК. Среднее соотношение коэффициентов поглощения A_{260}/A_{280} составило 1,71. Концентрация ДНК в препаратах, выделенных из плавников стерляди, в среднем составила 6,42 мг/мл.

Целостность полученной ДНК проверяли электрофоретически в 2%-ном агарозном геле (SeaKem LE Agarose, LONZA) с использованием ТВЕ-буфера. Ниже приведено изображение полученного геля с препаратами выделенной

ДНК (рис. 1). На изображении видны четкие одиночные полосы, а также заметно отсутствие шлейфа из ДНК. Вышеизложенные характеристики свидетельствуют о высокомолярной целостности ДНК.

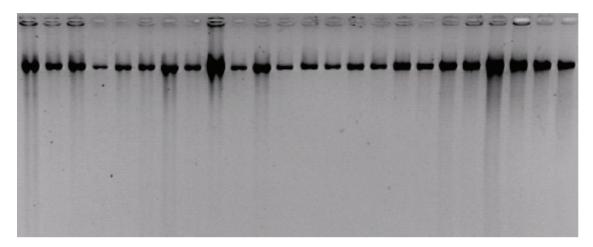


Рис. 1. Агарозный гель с препаратами выделенной ДНК

Для выполнения молекулярно-генетических исследований был использован микросателлитный метод изучения ДНК по четырем микросателлитным локусам: LS-68, LS-19, LS-39 и Aox-45, по которым зарубежными исследователями был выявлен полиморфизм

среди 5 различных популяций стерляди из рек Днепр, Днестр, Волга, Кама и Дунай [9, 17].

Последовательность праймеров, использованных ими при проведении исследований представлена в табл. 2.

 Таблица 2

 Последовательность праймеров к исследуемым микросателлитным локусам

Название праймера	Последовательность	
LS-19F	5'-CATCTTAGCCGTCTGGGTAC-3'	
LS-19R	5'-CAGGTCCCTAATACAATGGC-3'	
LS-39F	5'-TTCTGAAGTTCACACATTG-3'	
LS-39R	5'-ATGGAGCATTATTGGAAGG-3'	
LS-68F	5'-TTATTGCATGGTGTAGCTAAAC-3'	
LS-68R	5'-AGCCCAACACAGACAATATC-3'	
Aox-45F	5'-TTGTTCAATAGTTTCCAACGC-3'	
Aox-45R	5'-TGTGCTCCTGCTTTTACTGTC-3'	

При проведении наших исследований ПЦР выполняли на амплификаторе MyCycler (Bio-Rad, США). Реакционная ПЦР-смесь объемом 25 мкл содержала ПЦР-буфер 10x (c KCl) (Primtech); 3,3 мМ MgCl₂, раствор dNTP's 10x; $\approx 0,4$ мкМ каждого праймера; 0,06 ед./мкл Таq ДНК-полимеразы (Primtech) и 1мкл ДНК рыб. Температурный режим амплификации представлен в табл. 3

Продукты амплификации (10 мкл реакцион-

ной смеси) разделяли в 2,5%-ном агарозном геле (SeaKem LE Agarose, LONZA) в ТВЕ-буфере. Гель окрашивали этидиум бромидом.

Частоту каждого аллеля по определенному локусу вычисляли как процент от общего количества аллелей по данному локусу. Все математические вычисления производили в программе Statistica 6.0. Обработку и анализ гелей производили в программе Quantity One 4.4.0.

Таблица 3

Температурный режим амплификации

Шаг		Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
	I	94	5'	1
	Денатурация	94	1'	
II	Отжиг	55	30"	33
	Элонгация	72	30"	
	III	72	5'	1
	IV	4	До ∞	1

Результаты и обсуждение

Анализ полученных результатов молекулярногенетических исследований стерляди в 2009 г. проводили по тем же четырем микросателлитным локусам LS-68, LS-19, LS-39 и Aox-45, что и в 2008 г.

У анализируемых образцов с частотой 21,31% был обнаружен аллель (140) по локусу

LS-68, характерный только для днестровской популяции стерляди (присутствовал у 54% исследуемых особей), и с частотой 9,84% аллель (235) по тому же локусу, характерный только для днепровской популяции стерляди (присутствовал у 25% особей) (рис. 2).

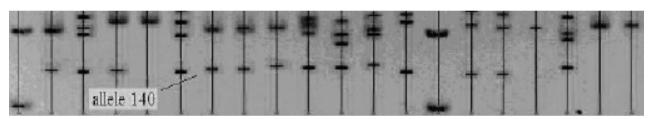


Рис. 2. Агарозный гель продуктов амплификации по микросателллитному локусу LS-68 у стерляди

Также у исследуемых образцов с частотой 27,58% присутствовал аллель (150) по локусу LS-19, характерный только для днестровской

популяции (отмечен у 33% особей) (рис. 3). Данные аллели отсутствовали у особей стерляди, принадлежащих к волжской популяции [17].

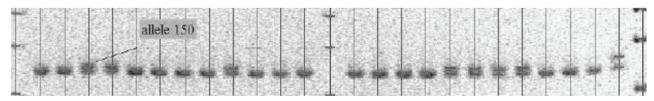


Рис. 3. Агарозный гель продуктов амплификации по микросателлитному локусу LS-19 у стерляди

Для локуса LS-39, по сведениям польских и украинских ученых, не выявлено специфических аллелей у различных популяций стерляди [17]. На рис. 4 приведено изображение геля со спектром продуктов амплификации полокусу LS-39. По данному локусу кроме аллелей, выявленных в исследованиях зарубежных ученых, также было подтверждено наличие аллеля в 148 п.о., который был продемонстри-

рован нами в предыдущих исследованиях по идентификации стерляди [8]. В наших исследованиях данный аллель встречался с частотой 9,38% (у 12,5% особей). Также нами был выявлен еще один аллель в 152 п.о., который ранее не был описан и встречался с частотой 16,62% (у 21% исследуемых особей). Возможно, данные аллели (148, 152) характерны для популяции стерляди Днестра и Днепра.



Рис. 4. Агарозный гель продуктов амплификации по микросателлитному локусу LS-39 у стерляди

По локусу Аох-45 зарубежными учеными [17] были отмечены специфические аллели, характерные для популяций стерляди из Волги и Днестра. Для днестровской популяции был специфичен аллель в 118 п.о., а для волжской – в 121 п.о.

В наших исследованиях по локусу Аох-45 был обнаружен аллель в 120 п.о., который встречался с частотой 20,56% (33,33% особей) (рис. 5). Однако представляется затруднительным отнести этот аллель к одному из двух маркеров, так как разница в три нуклеотида трудно вычленяема.

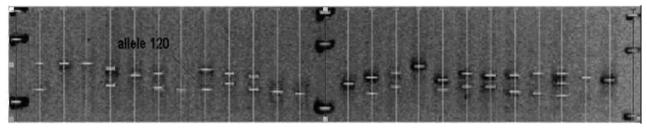


Рис. 5. Агарозный гель продуктов амплификации по микросателлитному локусу Aox-45 у стерляди

Таким образом, результаты повторных молекулярно-генетических исследований. полученные в 2009 г., подтвердили гипотезу днестровско-днепровского происхождения стерляди, завезенной в 2000 году из ГУДП «Конаковский завод товарного осетроводства» (Российская Федерация) в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области. Установлено, что аллели в 140 и 235 п.о. по локусу LS-68, аллель в 150 п.о. по локусу LS-19 являются специфичными для популяций стерляди Днестра и Днепра. Аллели 148 и 152 п.о. по локусу LS-39, возможно, также могут быть использованы для идентификации популяций днестровской и днепровской стерляди. Считаем, что использование локуса Аох-45 в дальнейших исследованиях при идентификации популяционного происхождения стерляди является нецелесообразным.

В табл. 4-7 представлены обобщенные за два года (2008-2009 гг.) результаты генетической идентификации производителей стерляди в ОАО «Рыбхоз «Полесье». Исследованиям подвергнуто 20% маточного стада.

Как свидетельствуют данные, представленные в табл. 4, у анализируемых нами образцов, отобранных у 48 экз. производителей стерляди, по локусу LS-68 были обнаружены два специфических аллеля: (140), характерный только для днестровской популяции стерляди, с частотой 23,66% (присутствовал у 64,58% исследуемых особей) и (235), по тому же локусу, характерный только для днепровской популяции стерляди, с частотой 9,16% (присутствовал у 25% исследуемых особей).

Таблица 4
Обобщенные результаты генетической идентификации у 48 экземпляров стерляди
(Acipenser ruthenus L.) по локусу LS-68

Локус		Частота аллелей, %	Количество особей, %	
LS-68	140	23,66	64,58	
LS-08	235	9,16	25,0	

Для локуса LS-19 был обнаружен специфический аллель (150), характерный только для

днестровской популяции стерляди, с частотой 27,94% (отмечен у 39,58% особей) (табл.5).

 Таблица 5

 Обобщенные результаты генетической идентификации у 48 экземпляров стерляди (Acipenser ruthenus L.) по локусу LS-19

Локус		Частота аллелей, %	Количество особей, %
LS-19	150	27,94	39,58

По локусу LS-39 нами был обнаружен аллель (148) с частотой 13,33% (присутствовал у 20,85% особей) и аллель (152) с частотой 6,66% (отмечен у 10,42% особей) (табл.6).

Считаем, что обнаруженные нами аллели по локусу LS-39, также характерны для популяции стерляди Днестра и Днепра.

Таблица 6 Обобщенные результаты генетической идентификации у 48 экземпляров стерляди (Acipenser ruthenus L.) по локусу LS-39

Локус		Частота аллелей, %	Количество особей, %
10.20	148	13,33	20,85
LS-39	152	6,66	10,42

Как свидетельствуют данные, представленные в табл. 7, для локуса Аох-45 нами был обнаружен аллель (120), который встречался с частотой 8,33% (присутствовал у 18,75% исследуемых особей). По данным польских и украинских ученых, именно по этому локусу были отмечены специфические аллели, по отдельности характерные для популяций стерляди Волги и Днестра (для днестровской популяции оказал-

ся специфичен аллель в 118 п.о., для волжской – в 121 п.о.) [17]. Однако, обобщив массив полученных данных за 2 года, мы считаем, что данный аллель не может быть использован при идентификации принадлежности стерляди к той или иной популяции (Днестр, Волга), так как затруднительно дать точную оценку, к какому молекулярному маркеру следует отнести обнаруженный аллель, по разнице в три нуклеотида.

 Таблица 7

 Обобщенные результаты генетической идентификации у 48 экземпляров стерляди (Acipenser ruthenus L.) по локусу Aox-45

Ш			11	IC
	Локус		Частота аллелей, %	Количество особей, %
	Aox-45	120	8,33	18,75

Заключение

Результаты повторных генетических исследований подтвердили, что завезенный в 2000 г. из ГУДП «Конаковский завод товарного осетроводства» (Российская Федерация) и выращенный до производителей в ОАО «Рыбхоз «Полесье» (Республика Беларусь) рыбопосадочный материал стерляди не принадлежал к волжской популяции стерляди (Каспий-

ский бассейн), а относился к популяциям рек Днестра и Днепра (Черноморский бассейн). На основании полученных нами за два года обобщенных данных, установлено, что аллели в 140 и 235 п.о. по локусу LS-68, аллель в 150 п.о. по локусу LS-19 можно рассматривать как специфические для стерляди Днестра и Днепра. Аллели (148 и 152) по локусу LS-39,

возможно, также могут быть использованы для идентификации популяций днестровской и днепровской стерляди.

Установлено также, что микросателлитные маркеры ДНК являются эффективным средством в определении популяционной принадлежности осетровых.

Полученные факты, свидетельствующие о днестровско-днепровском происхождении стерляди в одном из рыбоводных хозяйств республики, открывают реальные перспективы для выполнения работ по реинтродукции, выращиваемой в белорусском хозяйстве стерляди в реки бассейна Днепра и Днестра с целью

восстановления численности популяций, находящихся под угрозой исчезновения и занесенных в Красные книги Республики Беларусь, Российской Федерации, Украины и Молдовы.

Считаем, что для разработки практических рекомендаций по интродукции стерляди из рыбоводных хозяйств в реки трансграничных регионов бассейнов Днепра и Днестра необходимо проведение широкомасштабного международного проекта по генетической инвентаризации маточных стад стерляди в рыбоводных хозяйствах всех стран-участниц, а также изучению мест выпуска стерляди в естественные ареалы обитания.

Список использованных источников

- 1. Барулин, Н.В. Аквакультура осетровых рыб / Н.В. Барулин, А.И. Лашкевич // Интенсивные рыбные технологии [Электронный ресурс]. 2007. Режим доступа: http://www.nft.by/index.php?name=Pages&op=page&pid=10&pagenum=1. Дата доступа: 25.08.2010.
- 2. Васильева, Л.М. Биологические и технологические особенности товарной аквакультуры осетровых в условиях Нижнего Поволжья. Астрахань, 2000. 189 с.
- 3. Кончиц, В., Мамедов, Р. Осетроводство в Беларуси. Состояние и перспективы // Сб. науч. статей посвящ. 60-летию научно-исследоват. рыбох. станции. Кишинев, 2005. С. 38–40.
- 4. Рожкован, К.В. Молекулярная эволюция 18S рДНК и генетическое разнообразие осетров Амура Acipenser schrenckii (Brandt, 1896) и Huso dauricus (Georgii, 1775): Автореферат дисс. на соискание уч. ст. канд. биол. наук Рожкован, К.В.: 03.00.15 / К.В. Рожкован; Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН. Владивосток, 2008. 22 с.
- 5. Рожкован, К.В., Челомина, Г.Н., Рачек, Е.И. Идентификация межвидовых гибридов осетровых рыб методом RAPD-PCR анализа // Сб. науч. тр. Молекулярная и прикладная генетика: Международная научная конференция «Современные проблемы генетики». Минск, 2005. Том 1. С. 110.
- 6. Шандиков, Г. Русский осетр и его родственники / Г. Шандиков // Электронный

- журнал: Экспедиция. 2004. №1 (2). Режим доступа: http://www.qzhyh.com/04/beluga.html. Дата доступа: 25.08.2010.
- 7. Krieger, J. Evidence for a Slowed Rate of Molecular Evolution in the Order Acipenserriformes / J. Krieger, P.A. Fuerest // Mol. Biol. Evol. / Department of Molecular Genetics and Department of Evolution, Ecology and Organismal Biology, The Ohio State University. − Ohio, 2002. − Vol. 19, №6. − P. 891–897.
- 8. Красная Книга Республики Беларусь. Животные. Минск: Бел. энцыклапедыя, 2004. С. 181—182.
- 9. Coad, B.W. Species Account Acipenseridae / B.W. Coad // Freshwater Fishes of Iran. 2009. Vol. 1. P. 1–13.
- 10. Ludwig, A. First evidence of hybridization between endangered sterlets (*Acipenser ruthenus*) and exotic Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) in the Danube River / A. Ludwing, S. Lippold, L. Debus // Biol Invasions. 2009. Vol. 11. P. 753–760.
- 11. Козлов, В.И. Технология выращивания осетровых рыб/Л.С. Абрамович, В.И. Козлов// Товарное осетроводство. М.,1980. С. 70–73.
- 12. Kolman, R., Kapusta, A. Actual status and active protection of sturgeon fish populations endangered by extinction / R. Kolman, A. Kapusta. Wyd. IRS. 2008. 310 p.
- 13. Timoshkina, N. Intraspecific genetic polymorphism of Russian Sturgeon Acipenser gueldenstaedtii / N. Timoshkina, A. Barmintseva, A. Usatov, N. Mugue // Animal Genetic. –

- 2009. Vol. 45. P. 1098-1106.
- 14. Timoshkina, N. Molecular-genetic markers in studies of intra- and Intrerspecies polymorphism in surgeon (*Acipenseriformes*) / N. Timoshkina, D. Vodolazhskii, A. Usatov // Ekologicheskaya Genetika. 2010. Vol. 8, №1. P. 12–24.
- 15. Fopp-Bayat, D. Microsatellite DNA variation in the Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* (*Actinopterygii*, *Acipenseriformes*, *Acipenseridae*), cultured in a polish fish farm / D. Fopp-Bayat // Acta ichtyologica et piscatoria. −2010. − Vol. 40, №1. − P. 21–25.
- 16. Слуквин, А.М., Конева, О.Ю., Лесюк, М.И. Генетическая идентификация

- стерляди (Acipenser ruthenus L.), выращенной в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области, по микросателлитным маркерам // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. Минск, 2009. Том 9. С. 146—152.
- 17. Fopp-Bayat, D., Kolman, R., Tretyak, A., Woznicki, P. Microsatellite DNA analysis of sterlet (*Acipenser ruthenus* Brandt) from five European river drainage areas. Actual status and active protection of sturgeon fish populations endangered by extinction [Aktualny stan i aktywna ochrona naturalnych populacji ryb jesiotrowatych zagrożonych wyginięciem] / R. Kolman, A. Kapusta. Wyd. IRS. 2008. P. 223–234.

Дата поступления статьи 27 октября 2011 г.

А.С. Сапун, О.В. Квитко, И.И. Конева, Я.И. Шейко, Н.А. Балашенко, С.Е. Дромашко

СПОНТАННАЯ ИММОРТАЛИЗАЦИЯ ФИБРОБЛАСТОВ КРЫСЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO*

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

В связи с неуклонным ростом частоты онкологических заболеваний, одной из ключевых проблем современной медицины и биологии является понимание закономерностей процессов иммортализации и онкотрансформации. Несмотря на впечатляющие достижения генетики соматических клеток в изучении малигнизации, во многом остается неизвестной последовательность событий, развивающихся в ходе этого процесса. До конца также не изучены причины приобретения потенциального бессмертия раковых клеток и преодоления ими так называемого лимита Хайфлика. Еще в 1961 году в работах Леонарда Хайфлика и Пауля Мурхеда было установлено, что репликативный потенциал нормальных диплоидных клеток млекопитающих ограничен. Они показали, что культуры диплоидных клеток проходят *in vitro* 3 стадии. I стадия – это период адаптации первичной культуры к условиям культивирования, II стадия представляет собой этап роста, когда клетки делятся определенное число раз, а на III стадии пролиферация прекращается и наступает репликативное старение (популяции клеток сохраняют жизнеспособность, но митотических делений не происходит), после чего наступает кризис – клетки дегенерируют и погибают. Пролиферативный потенциал клеток, культивируемых in vitro, коррелирует с видовой продолжительностью жизни: для эмбриональных фибробластов (ЭФ) человека он может составлять от 40 до 60 удвоений клеточных популяций, для ЭФ крысы – 14-28, для клеток мышей – 10-20 [1]. Однако существуют исключения из этого правила: иммортализированные и раковые клетки.

Иммортализированные и раковые культуры обладают способностью к неограниченной пролиферации и могут преодолевать клеточное старение. Различие между иммор-

тализированными и раковыми клетками, культивируемыми *in vitro*, заключается в способности раковых клеток вызывать развитие злокачественных новообразований при трансплантации их восприимчивым животным [2]. Для проведения таких исследований, как правило, используются иммунодефицитные мыши линии SCID (severe combined immunodeficiency mice) — мыши с тяжелой иммунологической недостаточностью, которая определяется отсутствием Т— и В—лимфоцитов, а также мыши NOD—SCID (Nonobese Diabetic SCID), у которых развивается диабет без ожирения и иммунодефицит с отсутствием Т—, В— и NK—лимфоцитов [3].

Иммортализация является ключевой стадией канцерогенеза, но недостаточной для опухолевой прогрессии. Так, было показано, что мутация онкогена газ вызывает раковую трансформацию SV40—иммортализированных фибробластов, но не приводит к злокачественному перерождению нормальных фибробластов человека (не трансфецированных палиомавирусом SV40) [4]. При сходных экспериментах, связанных с изменением активностей генов опухолевых супрессоров, таких как р53 и р16 INK4a, онкотрансформация наблюдалась в культурах фибробластов человека, предварительно иммортализированных вирусом SV40 [5, 6].

К генам иммортализации можно отнести myc [7], p16/p53 [5, 6], bcl–2 [8], ras [9], fos [10] и др. Общим для этих генов является то, что они кодируют ядерные белки, связывающиеся с ДНК и ядерным матриксом. Кроме того, их активация осуществляется не только путем мутаций, при которых изменяется нуклеотидная последовательность кодирующего участка

гена, но и посредством амплификации и эпигенетической регуляции, одним из механизмов которой является метилирование цитозиновых оснований в ДНК [11, 12].

Иммортализация может быть спонтанной и индуцированной. Спонтанная иммортализация — редкое событие, которое происходит в культурах нормальных фибробластов человека с частотой 10-7–10-9 [13]. На рис. 1 приведена шкала, отражающая возможность клеток различного происхождения приобретать неогра-

ниченный пролиферативный потенциал [14]. В стареющих культурах фибробластов грызунов частота трансформации значительно выше, поэтому эмбриональные фибробласты крысы являются удобным объектом для изучения процессов иммортализации и онкотрансформации в процессе длительного культивирования [15, 16]. Их можно использовать для изучения разных этапов малигнизации, что является важным для разработки новых эффективных способов профилактики, диагностики и терапии рака.

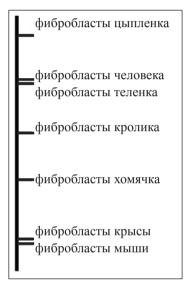


Рис. 1. Качественная шкала, демонстрирующая увеличение вероятности приобретения способности к неограниченной пролиферации клетками разной видовой принадлежности

Целью настоящей работы было исследование этапов спонтанной иммортализации и онкотрансформации путем анализа морфологических и функциональных характеристик фибробластов крысы при их длительном культивировании *in vitro* с помощью метода компьютерной видеомикроскопии.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали культивируемые *in vitro* эмбриональные фибробласты крысы. Для получения первичной клеточной линии кожно-мышечную ткань 8-14-дневных эмбрионов крысы переводили в культуру клеток. Для этого измельченную ткань дезагрегировали 0,25%-ным раствором трипсина при 37 °C в течение 30 мин. После удаления трипсина осадок ресуспендировали в ростовой среде, добавляли в культуральный сосуд CO₂ (5% от объеме сосуда) с помощью шприца, герметически закупоривали сосуд и культивировали клетки при 37 °C.

Для длительного поддержания фибробластов крысы использовались 2 способа. При

первом клеточный монослой 1 раз в неделю обрабатывали последовательно раствором Версена, а затем 0,25%-ным раствором трипсина, после чего ферменты отмывали средой Игла, суспендировали клетки и высевали их в новые культуральные сосуды. При втором, менее трудоемком способе, культуру поддерживали путем еженедельной смены среды. Культуральная среда содержала среду DMEM, 10% эмбриональной сыворотки телят (ЭТС) и антибиотики (0,01% пенициллина и стрептомицина). Монослойные культуры, полученные из эмбрионов крысы, характеризуются фибробластоподобным типом роста.

Для анализа живых иммортализированных фибробластов крысы использовали компьютерный видеокомплекс, включающий инвертированный микроскоп с термокамерой и цветную видеокамеру, подключенную к компьютеру. Для компьютерной видеосъемки сосуд Карреля с клетками помещали в термокамеру (37 °C) инвертированного микроскопа. С помощью визуального просмотра выбирали участок культуры на дне культурального сосуда и выполняли автоматическое компьютерное фотографирование либо видеосъемку клеток.

Для проведения детального анализа в некоторых экспериментах по видеомикроскопии живых клеток использовались специально изготовленные стеклянные вкладыши. Они имели размеры $25 \times 10 \times 1$ мм и были разделены на квадратные $(1 \times 1 \text{ мм})$ участки бороздками шириной 0,2 мм и глубиной 0,05 мм. Бороздки препятствовали перемещению клеток из одного квадрата в другой, что обеспечивало удобство анализа роста кульгуры. При этом плотность посева составляла 1500-2000 клеток на 1 см^2 , что позволяло анализировать события на уровне отдельных фибробластов и их клеточных потомств.

Результаты и обсуждение

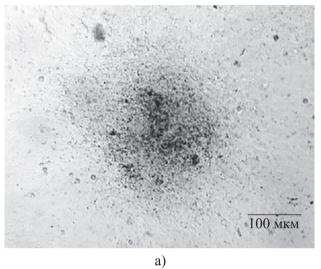
Впервые смену культуральной среды в сосуде с первичной культурой эмбриональных фибробластов крысы (ЭФК) осуществили на вторые сутки культивирования. Культура достигла состояния конфлуентности на седьмые сутки культивирования. Можно предположить, что в течение этого времени в клеточной культуре уже произошли процессы старения, сопровождающиеся уменьшением пролиферативной активности. По опубликованным данным, торможение клеточного деления первичных культур млекопитающих на ранних этапах культивирования может рассматриваться как проявление так называемого внешнего клеточного старения [17]. Внешнее, или преждевременное, старение в культуре клеток основано на механизме, который активируется при повышении содержания кислорода в газовой среде, и отличается от «внутреннего» репликативного старения. Так, для клеток человека репликативное старение коррелирует с укорочением теломер концевых участков хромосом, состоящих из тысяч тандемных повторов (TTAGGG), при каждом клеточном делении за счет выключения фермента теломеразы, которое происходит на ранних этапах эмбриогенеза [18]. Клетки грызунов отличаются длинными стабильными теломерами и снабжены системой воспроизведения концевых участков хромосом, что предохраняет их от репликативного старения, но они, в то же время, более чувствительны к внешнему старению. В работе Симоны Паринелли и сотрудников показано, что феномен преждевременного старения в большей степени свойственен фибробластам мыши (ФМ), чем фибробластам человека (ФЧ). ФМ не проявляли ускоренного старения при физиологическом уровне кислорода (3%), а при атмосферном содержании кислорода (20%) они либо приобретали способность к неограниченной пролиферации, либо переставали размножаться вовсе [17]. Механизм преждевременного старения связывают с работой ингибиторов циклин-зависимых киназ, причем их активация приводит к необратимой остановке клеточного цикла, и наоборот, их инактивация способствует малигнизации [19, 20]. ФЧ обладали меньшей чувствительностью к действию кислорода, что отражалось лишь в кратковременном снижении скорости пролиферации. Следовательно, у грызунов, в отличие от человека, вследствие относительно меньшей резистентности к стрессовым воздействиям пусковые механизмы спонтанной иммортализации могут срабатывать раньше, уже при переводе клеток в культуру, и проявляться в виде увеличения пролиферативного потенциала в части клеточной популяции, нарушения контактного ингибирования и возникновения клональной гетерогенности.

После 21 суток культивирования (III пассаж) конфлуентный монослой из фибробластоподобных клеток трипсинизировали. Клетки подсчитывали в камере Горяева и высевали при плотности 10 000 клеток на 1 см² в два стеклянных культуральных сосуда (культуры 1 и 2) (IV пассаж). В сосуд с культурой 1 помещали стеклянный вкладыш для последующего эксперимента по компьютерной видеосъемке (подробнее эксперимент описан ниже).

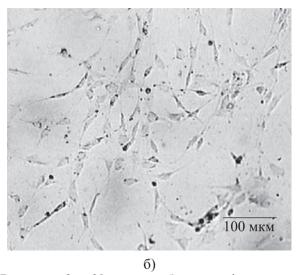
На 28-й день в обеих культурах образовался плотный монослой, состоящий из веретеновидных клеток. В культуре 1 сменили отработанную культуральную среду, одновременно в культуре 2 был осуществлен трипсиновый пересев клеточного монослоя (пассаж V). На 30-е сутки экспе-

римента в культуре 1 зарегистрировали единичные многослойные агрегаты на фоне монослоя, состоящего из веретеновидных клеток (рис. 2а), в то время как в культуре 2 единичные клетки лишь начинали формировать разреженный монослой

(рис. 2б). Формирование многослойных клеточных агрегатов свидетельствует о нарушении способности клеток к контактному торможению, что может быть одним из признаков иммортализации фибробластов крысы.



В культуре 1 на 30-е сутки в сплошном монослое веретеновидных клеток формируются участки загущения



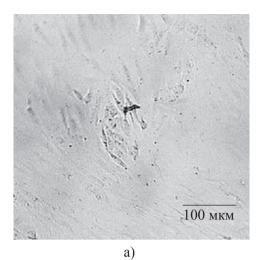
В культуре 2 на 30-е сутки наблюдается формирование разреженного монослоя

Рис. 2. Культуры фибробластов крысы после 30 суток культивирования

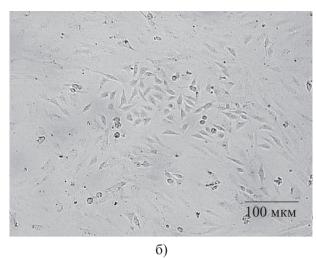
По истечении 36 дней в культуре 1 сменили культуральную среду, а в культуре 2 осуществили трипсиновый пересев (пассаж VI). На 41-й день культивирования в культуре 2 отметили снижение скорости пролиферации фибробластов крысы, местами наблюдали группы погибших клеток, т.е. культура вступила в стадию кризиса и старения, в то время как в культуре 1 плотность монослоя увеличивалась, количество многослойных агрегатов возрастало.

На 43-й день эксперимента в культуре 2 зарегистрировали появление клеток атипичной морфологии (округлой формы) на фоне разреженного монослоя веретеновидных клеток (рис. 3а и 3б). Для проверки того, появились ли клетки измененной морфологии в культуре 1, выращиваемой без пересевов, на 48-й день культивирования из флакона 2 извлекли стеклянный вкладыш и поместили его в новый культуральный сосуд 3 и подвергли клетки на вкладыше трипсинизации. Клетки ресуспендировали в среде в течение 5 минут, после чего во флакон с оставшимся вкладышем добавили 5% СО₂. Плотность посева культуры не превышала 3000 клеток на 1 см², что являлось приемлемым для проведения эксперимента по непрерывной видеосъемке клеточной культуры при частоте видеозаписи 1 кадр в 24 секунды.

Анализ видеофильма показал, что в культуре 1 и 3, так же как и в культуре 2, присутствовали округлые клетки, которые обладали более активной пролиферацией (по сравнению с популяцией веретеновидных клеток) и постепенно вытесняли последние (рис. 4). На рис. 4а видно, что через 24 часа 24 минуты на субстратной пластинке адгезировались группы веретеновидных клеток. Анализ видеозаписей показал, что некоторые клетки были погибшими. По истечении 80 часов 40 минут начали появляться группы морфологически измененных (округлых) клеток (рис. 4б). По прошествии еще 3 часов количество округлых и веретеновидных клеток в пределах одного участка субстратной пластинки стало приблизительно одинаковым (рис. 4в), но после 111 часов 40 минут от начала культивирования веретеновидные клетки начали укрупняться в размерах, причем количество их делений резко сократилось (рис. 4г), в то время как округлые клетки продолжали размножаться и постепенно полностью вытеснили веретеновидные (рис. 4 д-е).

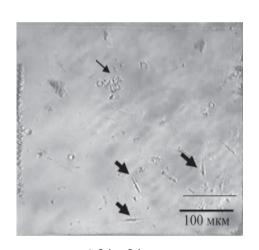


На 43-й день в культуре 2 появилась небольшая субпопуляция клеток более округлой формы (по сравнению с веретеновидными клетками окружающего монослоя)

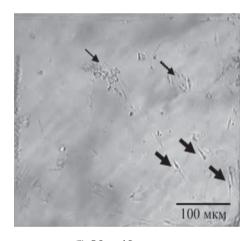


В культуре 2 на 43-е сутки зарегистрированы участки с клетками более округлой формы (по сравнению с окружающими участками монослоя веретеновидных клеток)

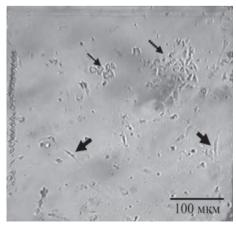
Рис. 3. Клональная гетерогенность в культуре фибробластов крысы как один из признаков иммортализации



а) 24 ч 24 мин



б) 80 ч 40 мин



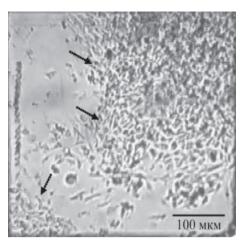
в) 83 ч 40 мин



г) 111 ч 40 мин







е) 196 ч 20 мин

Сплошной стрелкой отмечена группа погибших клеток, стрелками с пунктиром указаны разрастающиеся группы морфологически измененных (округлых) клеток, утолщенные стрелки указывают на оставшиеся единичные веретеновидные клетки, которые прекратили делиться и постепенно погибают

Рис. 4. Экспансия аномальных округлых клеток в культуре 1 (пояснения в тексте)

Полученные данные демонстрируют, что веретеновидные клетки обладают ограниченным пролиферативным потенциалом и не могут преодолевать механизмов клеточного старения, в то время как округлые клетки являются иммортализированными, т.е. приобретают способность к неограниченной пролиферации. Кроме того, впервые показано, что трансформированные клетки могут возникать не на поздних стадиях клеточного старения (кризиса), а на более ранних этапах культивирования.

В целом результаты данной работы показали многостадийность спонтанной иммортализации фибробластов крысы при их длительном культивировании *in vitro*. Причем первый этап спонтанного и необратимого перерождения эмбриональных фибробластов крысы в сторону злокачественного фенотипа связан с нарушением контактного ингибирования, а значит, и межклеточных взаимодействий, что проявляется в формировании многослойных фокусов из веретеновидных клеток. На втором этапе появляются клетки атипичной формы (округлые), несвойственные стареющим культурам фибробластов. Третий этап заключается в экспансии веретеновидных клеток округлыми.

Для более детализированной регистрации событий, ведущих к генерации иммортализированных округлых клеток в клоновых потомствах веретеновидных клеток требуются дополнительные исследования по непрерывной видеозаписи при разреженных посевах фибробластов на более ранних пассажах. При этом важно учитывать, что частота процессов дифференцировки веретеновидных клеток в клетки округлой формы может быть невысокой, особенно в культурах клеток человека. Поэтому целесообразно использовать параллельную (одновременную) видеозапись многих участков клеточных культур с помощью автоматизированных видеокомплексов, в частности, видеокомплекса «Цитомир», разработанного нами совместно ГНПО «Планар» [21].

Заключение

С помощью компьютерной микроскопии были описаны закономерности спонтанной иммортализации и дальнейших изменений клеточной популяции в направлении ракового фенотипа в культурах фибробластов, полу-

ченных из эмбриона крысы. При длительном культивировании эмбриональных фибробластов крысы *in vitro* на первом этапе иммортализации наблюдалось образование монослоя с многослойными агрегатами (фокусами) из ве-

ретеновидных клеток. Второй этап заключался в появлении единичных округлых клеток, несвойственных стареющим культурам фибробластов. На третьем этапе округлые клетки полностью вытесняли веретеновидные. Установлено, что веретеновидные клетки обладают ограниченным пролиферативным потенциалом,

в то время как округлые клетки являются иммортализированными, т.е. приобретают способность к неограниченной пролиферации. Кроме того, впервые показано, что трансформированные клетки могут возникать не на поздних стадиях клеточного старения (кризиса), а на более ранних этапах культивирования.

Список использованных источников

- 1. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains / L. Hayflick, P.S. Moorhead // Experimental Cell Research. 1961. Vol. 25. P. 177–185.
- 2. Troshko, J.E. Cancer stem cells and cancer nonstem cells: from adult stem cells or from reprogramming of differentiated somatic cells // Veterinary Pathology. 2009. Vol. 46, №2. P. 180.
- 3. Perryman, L.E. Animal models: Molecular pathology of severe combined immunodeficiency in mice, horses, and dogs / L.E. Perryman // Veterinary Pathology. 2004. Vol. 41, №2. P. 95–97.
- 4. Expression profiles of SV40-immortalization-associated genes upregulated in various human cancers / H.M. Jung [et al.] // Journal of Cellular Biochemistry. Vol. 106, №4. P. 703–705.
- 5. Jorgensen, M.K. The Influence of SV40 Immortalization of Human Fibroblasts on p53–Dependent Radiation Responses / M.K. Jorgensen, J. Timothy // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002. Vol. 257, №1. P. 168.
- 6. Knockdown of p53 combined with expression of the catalytic subunit of telomerase is sufficient to immortalize primary human ovarian surface epithelial cells / G. Yong [et al.] // Carcinogenesis. − 2006. − Vol. 28, №1. − P. 174.
- 7. C-myc Overexpression Causes Anaplasia in Medulloblastoma / D. Stearns [et al.] // Cancer Research. 2006. Vol. 66, №2. P. 673.
- 8. Suri, C. The Immunohistochemical Evaluation Of The Expression Of Bcl–2 In Different Histological Grades Of Squamous Cell Carcinoma / C. Suri // Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2009. №3. P. 189.

- 9. Expression of activated M-Ras in hemopoietic stem cells initiates leukemogenic transformation, immortalization and preferential generation of mast cells / X.Guo [et al.] // Oncogene. 2006. Vol. 25, №30. P. 441.
- 10. The expression and significance of proto-oncogene c-fos in viral myocarditis / S.Zhang [et al.] // Virology Journal. 2010. Vol. 7, №1. P. 285.
- 11. Агеенко, А.И. Новая диагностика рака: теория, диагностика, лечение, реабилитация / А.И. Агеенко. Москва: Медицина XX, 2004. 408 с.
- 12. Lele, R.D. Epigenetics gene silencing / R.D. Lele // The Journal of association of physicians of India. 2009. Vol. 60. P. 60.
- 13. Перестройки хромосом и их роль в спонтанной иммортализации и трансформации эмбриональных клеток крысы / Н.М. Ярцева [и др.] // Цитология. 2007. Т. 49, №4. С. 311—321.
- 14. Macierra-Caelho, A. Comparative biology of cell immortalization / A. Macierra-Caelho. Berlin: Springler, 2000. C. 51–80.
- 15. Simons J.W. Genetic, epigenetic, dysgenetic, and non-genetic mechanisms in tumorigenesis / J.W. Simons // Critical Reviews in Oncogenesis. 1995. Vol. 6, №3. P. 261–273.
- 16. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes / A. Balmain [etal.]//Carcinogenesis.-1999.-Vol.21,№3.-P. 371-377.
- 17. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts / S. Parrinello [et al.] // Nature. 2003. Vol. 5, №3. P. 740–749.
- 18. Oeseburg, H. Telomere biology in healthy aging and disease / H. Oeseburg. Berlin: Springler, 2009. P. 259–268.

- 19. Gorbunova, V. Cellular Senescence and Tumor Suppression / V. Gorbunova. Berlin: Springler, 2010. P. 175–197.
- 20. Aging mechanisms / Y. Takahashi [et al.] // PNAS. 2000. Vol. 97, №23. P. 12 407–12 408.
 - 21. Каталог приборов, комплексов и

научных установок, разработанных по подпрограмме «Научные приборы» Государственной научно-технической программы «Эталоны и научные приборы» (2006–2010 гг.) / под ред. В.Б. Ладо, А.Д. Широканова. — Минск: Институт физики НАН Беларуси, 2011. — С. 75–76.

Дата поступления статьи 19 декабря 2011 г.

О.В. Квитко, А.С. Сапун, И.И. Конева, Я.И. Шейко, Н.А. Балашенко, С.Е. Дромашко

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКЗОГЕННЫХ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ

(обзорная статья)

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Первоначальный интерес к использованию экзогенных полинуклеотидов в качестве биологически активных веществ возник в результате выяснения роли ДНК и РНК в передаче и реализации наследственной информации. Открытие процесса генетической трансформации, при котором молекулы экзогенной ДНК проникают в клетку, а также реплицируются и экспрессируются в клеточных поколениях посредством транскрипции (синтеза РНК), явилось основой для изучения биологического действия полинуклеотидов, вводимых in vivo и in vitro, с целью создания новых средств регуляции функций и лечения заболеваний. В соответствии с основополагающими открытиями молекулярной генетики, предполагалось, что экзогенные полинуклеотиды могут оказывать эффекты либо посредством внесения в клетку закодированной нуклеотидной последовательности, которая направляет матричный синтез РНК и белка, либо путем поставки в клетку «строительных блоков» в виде мононуклеотидов, возникающих в результате деградации экзогенных нуклеиновых кислот.

Появились сообщения о стимулирующих эффектах применения препаратов нуклеиновых кислот у человека, а также коммерческие предложения полинуклеотидных препаратов. Например, на интернет-сайтах [1-2] рекламируются капсулы дрожжевой РНК. Утверждается, что эффективность этого препарата обоснована работами доктора Бенджамина Франка (Dr. Benjamin Frank), который в 1961-1979 гг. обнаружил, что препараты РНК и ДНК, добавляемые в пищу (ежедневная дозировка от 300 миллиграммов до нескольких граммов) в сочетании с витаминами и минералами, замедляют процессы старения у человека [1].

К сожалению, в научной литературе отсутствуют работы, подтверждающие либо, напротив, опровергающие эту информацию. Вместе с тем, мезотерапевтическое введение ДНК и РНК (входящих в состав препаратов Деринат и Нуклеоспермат натрия) успешно применяется для профилактики и коррекции возрастных изменений кожи [3].

Одним из ключевых событий в изучении биологического действия экзогенных полинуклеотидов явилось открытие и изучение механизмов отчетливо выраженных иммуностимулирующих эффектов бактериальных ДНК. В результате этих исследований были открыты «неканонические» механизмы действия ДНК и РНК, основанные не на комплементарном взаимодействии полинуклеотидных цепей, а на регуляции процессов сигнальной трансдукции, запускаемых взаимодействием полинуклеотидных фрагментов с рецепторами внутри или на поверхности клетки. Иммуностимулирующие препараты на основе полинуклеотидов вошли в клиническую практику. Например, синтетические двунитчатые комплексы поли Г:Ц и поли А:У (препарат «Полудан») являются высокоактивными индукторами интерферона [4].

Количество обнаруженных механизмов, в которых ключевую роль играют нуклеиновые кислоты, постепенно увеличивалось. В частности, были выявлены механизмы, основанные на комплементарном взаимодействии последовательностей оснований, но не сводящиеся к матричным процессам, управляющим репликацией ДНК и РНК либо трансляцией последовательности нуклеотидов РНК в аминокислотную последовательность белка. В рамках этого направления значительны перспективы

использования в медицине каталитических полинуклеотидов – продуцируемых в клетках рибозимов и искусственно синтезируемых дезоксирибозимов, а также «антисмысловой терапии», основанной на ингибировании трансляции посредством комплементарного спаривания однонитевых рибонуклеотидов с матричной РНК. Кроме того, возрастает интерес к управлению генной экспрессией посредством РНК-интерференции — запускаемого двухцепочечными рибонуклеотидами (называемыми малыми интерферирующими РНК) селективного разрушения определенных матричных РНК.

Искусственно синтезируемые полинуклеотиды предоставляют дополнительный материал для подбора ДНК- и РНК-препаратов, обладающих различными биологическими эффектами.

Перспективной системой экспериментального тестирования полинуклеотидных препаратов является компьютерная видеомикроскопия живых клеточных культур, позволяющая в динамике прослеживать эффекты изучаемых веществ, изменения клеточных популяций в целом, а также на уровне единичных клеток и их клоновых потомств.

Стимулирующие эффекты полинуклеотидов и их компонентов in vitro и in vivo

В работе [5] было показано, что нуклеотиды и нуклеозиды, которые являются «строительными блоками» РНК и ДНК, стимулировали пролиферацию клеток различных типов, включая астроциты и менингиальные фибробасты эмбрионов цыплят, позитивные по фактору VIII эндотелиальные клетки капилляров мозга человека, 3Т3 клетки мыши и 2 клеточные линии астроцитомы человека. Полученные данные свидетельствовали также в пользу того, что аденозин и гуанозин стимулировали пролиферацию посредством активации аденозинового рецептора А2б, в то время как эффекты нуклетотидов могли быть опосредованы активацией пуринергических рецепторов P2y [5]. Нуклеиновые кислоты и их фрагменты оказывали митогенное действие на фибробласты [6], нейроглию [7] и остеобласты [8-9]. Полинуклеотиды могут действовать не только посредством сигнальных эффектов путем активации рецепторов, но и за счет поставки «строительного материала», образуемого при их деградации, а также путем индуцирования репарации ДНК [10]. Нуклеиновые кислоты и их компоненты проявляли синергизм с различными ростовыми факторами, например, с эпидермальным ростовым фактором EGF [11], а также PDGF, FGF и NGF [12].

Полидезоксирибонуклеотидные препараты ускоряли процессы приживления аутологичных трансплантатов кожи [13]. Полидезоксинуклеотидсодержащие гели на основе ДНК (фрагменты от 50 до 2000 пар оснований), экстрагированной из спермы лосося, ускоряли

регенерацию костей у крыс [14]. Полидезоксирибонуклеотиды из этого же источника (при интраперитонеальном введении в дозе 8 мг/кг) восстанавливали кровоток на экспериментальной модели сужения периферических артерий (облитерирующего эндотериита) у крыс [15].

Использование полидезоксирибонуклеотидов может оказаться более эффективным методом стимулирования продукции VEGF (фактора роста сосудов эндотелия) по сравнению с локальной доставкой VEGF или генной терапией – подходами, которые, к сожалению, к настоящему времени не оправдали возлагавшихся на них надежд [16]. Полинуклеотидная стимуляция аденозиновых рецепторов (А2 receptors) может индуцировать экспрессию VEGF во многих типах клеток в условиях гипоксической активизации сигнальных путей [16]. Важно, что в тестировании на острую и хроническую токсичность показана высокая степень безопасности применения этих препаратов. Их терапевтическая эффективность показана на экспериментальных моделях облитерирующего эндотериита и ишемии [16], при диабетических язвах нижних конечностей [17], нарушениях заживления ран и ожогах [18].

При тестикулярной ишемии у крыс полидезоксирибонуклеотиды повышали экспрессию гена VEGF на уровнях транскрипции и трансляции, понижали повреждение тканей и восстанавливали сперматогенную активность [19], а при индуцированном коллагеном артрите у мышей уменьшали продукцию цитокинов и ослабляли остроту заболевания [20].

Обнаружены стимулирующие эффекты препаратов ДНК на культивируемых клетках. Оптимальная концентрация (100 мкг/мл) полидезоксирибонуклеотидного препарата из плаценты человека улучшала рост фибробластов роговицы в первичной культуре фибробластов роговицы глаза [21]. Особо отмечается, что этот эффект был хорошо воспроизводим

на клеточных культурах, полученных от доноров старше 60 лет, что, по мнению авторов, может свидетельствовать о селективном положительном влиянии препарата на постаревшие клетки [21]. Препарат также обеспечивал рост клеточных культур клеток пигментного эпителия при уменьшенной концентрации сыворотки телят [21].

Сигнальные эффекты полинуклеотидов, опосредованные трансмембранными Толл-подобными рецепторами

Значительное развитие получило терапевтическое и профилактическое использование экзогенной ДНК для модулирования иммунитета [22]. ДНК, выделенные из бактерий, стимулируют иммунитет млекопитающих, причем эффективность ДНК определяется присутствием неметилированных нуклеотидов СрС [23]. Напротив, ДНК млекопитающих имеет малую частоту СрG-динуклеотидов, причем они в основном метилированы, в результате чего эти ДНК не обладают иммуностимулирущим эффектом, свойственным бактериальным ДНК [23]. CpG-богатая ДНК индуцирует воспалительный ответ, опосредованный Т-хелперными лимфоцитами. Клеточный ответ на введение СрG-ДНК опосредован трансмембранным Толл-подобным рецептором (Toll-like receptor) TLR9. Мыши, дефицитные по TLR9 (TLR9-/-), не проявляли ответа на СрG-ДНК, включая пролиферацию спленоцитов, продукцию цитокинов макрофагами и созревание дендритных клеток [23]. Накоплены данные, свидетельствующие о потенциале использования CpG-DNA в качестве адьюванта в терапии рака, аллергии и инфекционных болезней [23].

В терапевтических целях для стимулирования TLR9 целесообразно использовать синтетические олигонуклеотиды, содержащие один или более неметилированных СрСдинуклеотидов [24]. Для повышения рези-

стентности к нуклеазам можно применять фосфоротиоатные олигонуклеотиды [24]. Эффективность CpG-олигодинуклеотидов в терапии рака может быть повышена посредством предварительного ингибирования регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs). Необходимо отметить, что в большинстве случаев на опухолях мышей для эффективной монотерапии требуется инъекция СрG-ДНК непосредственно в опухоль [25], что является отражением общей проблемы целевой доставки лекарств в организме. Возможно, это является причиной отсутствия в клинических испытаниях антиопухолевой активности полинуклеотидных препаратов, несмотря на положительные данные на мышиных моделях [24]. Для терапевтической эффективности требуются определенные дозировки полинуклеотидных препаратов. Так, в клинических испытаниях терапии неоперабельного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) в комбинированной схеме применяли олигонуклеотидный препарат PF-3512676 (CpG 7909) в дозе 0,2 мг/кг массы тела (подкожно – s.c.) еженедельно [26].

Важно отметить, что некоторые Толлподобные рецепторы (помимо TLR9) могут связываться не только с CpG-богатой ДНК. Так, двунитевая РНК и poly I:С являются лигандами рецептора TLR3, а однонитевая РНК лигандом рецептора TLR8 [27].

Сигнальные эффекты полинуклеотидов, опосредованные цитозольными рецепторами

Помимо трансмембранных Толл-подобных рецепторов, ДНК может активизировать иммунитет посредством цитозольных сенсоров [28]. Так, ДНК из различных источников связываются посредством цитозольного рецептора DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory

factors) и активизируют интерферон типа I [28]. Кроме того, рецептор DAI, соединяясь с двунитевой ДНК, усиливает ее взаимодействие с фактором транскрипции IRF3 и серинтреониновой киназой ТВК1 [28].

Гломеруальные клетки клубочка почки не

экспрессируют рецептор TLR9, но, в то же время, двунитевая ДНК (причем не обогащенная СрG-динуклеотидами) активизировала в этих клетках продукцию цитокинов, хемокинов и интерферонов типа I, а также уменьшала клеточную пролиферацию [29]. 5'- трифосфатная РНК (3P-RNA) и двунитевая ДНК индуцируют общие, TLR-независимые синальные пути в первичных культурах мезангиальных клеток клубочков почки мыши [30]. При этом транскриптомный анализ показал, что 3Р-РНК и ДНК активизировали почти идентичные программы генной экспрессии, особенно провоспалительных генов цитокина IL-6, нескольких хемокинов и генов, связанных с интерферонами типа I [30]. Вместе с тем, с помощью селективного ингибирования малыми интерферирующими РНК (small interfering RNA) показано, что система опознавания 3Р-РНК

включает сигналинг рецептора Rig-1, в то время как для эффектов ДНК не требуются рецепторы Rig-1 и [30].

Важно отметить, что эффективность индуцирования мРНК интерферона бета (IFN-β) посредстовом цитозольного ДНК-сенсорных механизмов у линии клеток мыши L929 зависела от длины ДНК, причем фрагменты длиной 500-100 пар нуклеотидов были намного эффективнее по сравнению с фрагментами 100 пар нуклеотидов [31]. В этой работе использовали синтетические двунитевые ДНК фирмы Hokkaido System Science: poly(dA-dT)•poly(dTdA) (B-DNA), poly(dG-dC)•poly(dC-dG) и poly(rI:rC). Интересно также, что исследования на эмбриональных фибробластах мыши (MEFs) показали присутствие дополнительных (помимо DAI) цитозольных молекул, участвующих в иммунном ответе на ДНК [31].

Антисмысловая терапия

Если известна нуклеотидная последовательность данного гена, можно синтезировать нить ДНК или РНК, которая по комплементарному механизму соединяется с матричной РНК, транскрибируемой с данного гена, и инактивирует ее, «отключая» соответствующий ген [32]. Используются синтетические короткие фрагменты нуклеиновых кислот, называемые «антисмысловыми» олигонуклеотидами, потому что их последовательность оснований комплементарна матричной РНК гена, которая является «смысловой» последовательностью (например, смысловой сегмент матричной РНК 5'-AAGGUC-3' комплементарен антисмысловому сегменту ингибирующего олигонуклеотида 3'-UUCCAG-5) [32].

Ведутся исследования по использованию антисмысловых олигонуклеотдов в терапии рака (включая рак легкого, колоректальную карциному, карциному поджелудочной железы, малигнизированные глиомы и меланомы), диабета, амиотрофического латерального склероза, мышечной дистрофии Дюшена, астмы и артрита с воспалительным компонентом [32]. Некоторые препараты уже используются в клинике [32].

РНК-интерференция (см. ниже) была открыта Файером и Меллоу именно в экспериментах с антисмысловыми РНК. Особый интерес к антисмысловым РНК обусловлен их использованием для создания препаратов, избирательно инги-

бирующих гены, которые аномально активны в злокачественных клетках. В исследованиях по разработке новых антираковых препаратов утвердился термин антисенсорная (антисмысловая) терапия – «antisense therapy» [33]. Длина антисенсорных олигонуклеотидов составляет 14-20 нуклеотидов. Их эффект высоко специфичен (поскольку основан на их точной комплементарности участкам соответствующих матричных РНК) и позволяет репрессировать определенный ген, не затрагивая остальных. Вследствие высокой избирательности антисмысловой терапии ее также называют таргетной терапией (от англ. target – цель). Например, генасенс (Джента Инкорпорэйтед, США) является 18-мерфосфоротиоатом олигонуклеотида, имеющего сродство к участку мРНК, кодирующей белок Bcl-2, повышенная продукция которого в раковых клетках защищает их от апоптоза. На клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого показано, что генасенс снижает уровень Bcl-2, замедляет клеточную пролиферацию и ускоряет апоптоз. Генасенс также может усиливать противоопухолевую эффективность других препаратов, включая доцетаксел, паклитаксел, карбоплатин, винорельбин и ритуксимаб [34]. Генасенс поставляется во флаконах в виде раствора по 10 мл с содержанием 300 мг действующего вещества во всем объеме).

РНК-интерференция

Механизм РНК-интерференции основан на разрушении матричной РНК определенного гена особыми белками, образующими комплекс с небольшими (как правило, 20-30 нуклеотидных пар) молекулами двуспиральной РНК, в которых есть участок, комплементарный к соответствующему району матричной РНК [35]. Таким образом, регуляторная эффективность двуспиральной РНК напрямую определяется ее нуклеотидной последовательностью. Это открывает широкие возможности подбора двуспиральных РНК для управления работой различных генов. Следует также особо отметить, что в клетке имеются сотни генов, кодирующих большое количество разнообразных микроРНК, которые регулируют работу ряда других генов. Следовательно, в тотальных препаратах нуклеиновых кислот, выделяемых из организмов разных видов, из разных тканей одного вида и даже из разных индивидуумов в пределах одного вида, могут присутствовать различные наборы регуляторных РНК, что может определять их различный биологический эффект при введении в организм или в культуру клеток [36].

В исследовании, связанном с клиническими испытаниями системного введения малых интерферирующих РНК (small interfering RNAs – siRNAs) пациентам с солидными раковыми опухолями, использовали целевую доставку на основе наночастиц, что обеспечивало значительное селективное ингибирование избранных генов (уменьшение мРНК и белка) [37]. Наряду с наночастицами для адресной доставки интерферирующих РНК изучается использование липосом и катионных полимерных носителей [38]. В целом, однако, для разработки достаточно эффективных, с пролонгированным действием и безо-

пасных средств доставки интерферирующих ДНК требуется преодоление значительных препятствий [38].

В течение некоторого времени на основании работ, выполненных на дрозофиле, считалось, что существуют жесткие правила в отношении структуры малых интерферирующих РНК, эффективных в селективной блокировке генов. Эти правила включали наличие 3'-«оверхенга», фиксированной длины дуплекса и структурной симметрии [39]. Однако, на клетках млекопитающих обнаружено, что структура «сайленсирующих» РНК может быть весьма разнообразной. Более того, появились данные о том, что многие «неклассические» структурные варианты обладают преимуществами по сравнению с «классическими», включая повышенную эффективность, уменьшение неспецифических («боковых») эффектов и улучшенную доставку в клетки [39]. Компьютерный анализ выявил широкие возможности для разнообразных «побочных» эффектов интерферирующих РНК [40]. Это, с одной стороны, усложняет использование РНКинтерференции для избирательного ингибирования генов, а с другой – расширяет возможности открытия новых, заранее непредвиденных эффектов полинуклеотидов (особенно синтетических, с большой возможностью вариации параметров), которые могут предоставить дополнительный материал для поиска эффективных препаратов. С этой точки зрения представляется целесообразным включение системы тестирования полинуклеотидов с помощью разрабатываемых нами методов компьютерной видеомикроскопии живых клеточных культур, обеспечивающих выявление эффектов изучаемых факторов на уровне индивидуальных клеток и их клоновых потомств [41-42].

Рибозимы и дезоксирибозимы – каталитически активные полинуклеотиды

Рибозимы представляют собой молекулы РНК, обладающие способностью каталитически расщеплять другие молекулы РНК или самих себя [43-44]. До открытия рибозимов ферменты – белки, обладающие каталитическими свойствами, — считались единственными органическими катализаторами. В 1967 г. Карл Вёзе, Френсис Крик и Лесли Оргель впервые

выдвинули предположение, что РНК может быть катализатором (цит. по [45]). Это предположение основывалось на том, что РНК может образовывать сложную вторичную структуру. Сейчас известно, что рибозимы и многие другие молекулы РНК имеют сложную третичную структуру. Каталитическая активность РНК впервые была обнаружена в 1980-е гг. у пре-

рРНК Томасом Чеком, изучавшим сплайсинг РНК у инфузории, и Сидни Альтманом, работавшим с бактериальной рибонуклеазой Р. Рибозимом оказался участок молекулы пре-рРНК Теtrahymena, кодируемый интроном внехромосомного гена рДНК. Этот участок осуществлял аутосплайсинг, то есть сам вырезал себя при созревании рРНК. Каталитическая активность также была обнаружена в РНК-субъединице комплекса рибонуклеазы Р, участвующей в обработке пре-тРНК. В 1989 г. Чек и Альтман за обнаружение каталитических свойств РНК получили Нобелевскую премию по химии (цит. по [45]).

Термин «рибозим» был введен в 1982 г. [46]. С тех пор были открыты новые классы рибозимов естественного происхождения, а также были созданы синтетические рибозимы, включая рибозимы, разрушающие РНК вируса иммунодефицита человека [47]. Рибозимная инженерия позволяет осуществлять *in vitro* селекцию синтетических рибозимов с уникальными свойствами, что (в сочетании с решением проблем адресной доставки в организме) определяет значительный потенциал их терапевтического использования, включая противораковую и антивирусную терапию [43], а также лечение ревматоидного артрита и сердечно-сосудистых заболеваний [44].

Дезоксирибозимы – искусственно синтезируемые однонитевые молекулы ДНК, которые также называют ДНК-энзимами, и способные каталитически расщеплять определенные РНК [48]. В 1997 г. Санторо и Джойсом была разработана методика «систематической эволюции лигандов посредством экспоненциального обогащения» — SE-LEX, при которой проводится селекция приблизительно 1014 потенциальных однонитевых

ДНК-энзимов по способности расщеплять данную РНК [49]. Для предотвращения разрушения нуклеазами используются модификации, например, включение фосфоротиоатных нуклеотидов [50]. Посредством процедуры обогащения каталитических молекул ДНК были получены 2 дезоксирибозима с длиной 35 нуклеотидов, в которых 13 и 15 нуклеотидов образуют каталитическую петлю [51]. «Таргетная» специфичность по отношению последовательности РНК контролируется последовательностью соединяющихся с РНК участков дезоксирибозима, которые составляют 8-12 нуклеотидов.

Для разрушения матричной РНК эти дезоксирибозимы требуют присутствия дивалентных ионов металлов. Таких как Са²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ или Cu²⁺. Однако, дезоксирибозим Na8 разрушает РНК в отсутствие дивалентных металлов [52]. Для работы другого дезоксирибозима требуется 1-гистидин [53]. Для эффективного разрушения РНК не требуется полная комплементарность с соответствующим узнающим участком дезоксирибозима. Так, в случае дезоксирибонуклеотида под кодовым номером 10-23 необходимо наличие в «таргетной» РНК динуклеотидов G-C, G-U, A-С или A-U, в то время как для 8-17 дезоксирибозима в опознаваемой последовательности РНК требуется только один динуклеотид А-G [51].

Дезоксирибонуклеотиды имеют низкую стоимость производства и являются ценным потенциальным средством для терапии. Созданы дезоксирибозимы, ингибирующие гены против генов с-Jun и XT (ксилозилтрансферазы), из которых первый может быть применен в лечении многих нейрологических заболеваний, а второй – при повреждениях позвоночника [48].

Различия в действии полинуклеотидов на клетки разных типов

Как отмечалось выше, эффекты ДНК на клетки могут быть обусловлены Толлподобными рецепторами (TLR). ДНК *E. Coli* и синтетические СрG-богатые олигонуклеотиды (но не ДНК тимуса теленка) в концентрации 1-50 мкг/мл при воздействии в течение 6-48 часов стимулировали продукцию матричной РНК интерлейкина IL-8На трех эпителиальных клеток кишечника (Т84, НТ-

29, Caco-2), конститутивно экспрессирующих мРНК рецептора TLR9, отвечающего за известные эффекты бактериальных ДНК на иммунитет [54]. В то же время, в линии фибробластов CCD-18Co не обнаружено амплификации мРНК TLR9 [54]. Следовательно, клетки разных типов могут по-разному реагировать на воздействие одних и те же полинуклеотидов.

В опухолях чешуйчатой карциномы пищевода 87 пациентов с помощью полимеразной цепной реакции и иммуногистохимии наблюдали сверхэкспрессию (по сравнению с нормальной тканью) генов Толл-подобных рецепторов TLR3, TLR4, TLR7 и TLR9 [55]. Следовательно, раковые клетки могут обладать повышенной реактивностью к полинуклеотидам, действующим посредством TLR-сигналинга.

Выше были представлены данные о стимулирующих эффектах полинуклеотидов на первичные культуры нормальных клеток [5-12]. В то же время, СрG-богатые олигонуклеотиды при введении *in vitro* и *in vivo* индуциру-

ют апоптоз в малигнизированных В-клетках при хронической лейкемии [56]. Эти данные демонстрируют перспективу использования полинуклеотидных препаратов в терапии лейкемии. В пользу перспективности подбора полинуклеотидных препаратов для противораковой терапии свидетельствует также ингибирующий эффект коммерческого препарата ДНК из эритроцитов цыплят на культуру клеток HeLa [57]. Механизм обнаруженного эффекта неизвестен и может быть обусловлен как проникновением фрагментов ДНК в клетку [58], так и их сигнальным воздействием посредством мембранных рецепторов [36].

Заключение

В ряде исследований продемонстрированы перспективы использования выделяемых из природных источников и искусственно синтезируемых экзогенных ДНК и РНК в регуляции процессов жизнедеятельности *in vivo* и *in vitro*. Разнообразие обнаруженных и, по-видимому,

еще не открытых механизмов биологического действия различных полинуклеотидов в сочетании с технологиями их синтеза открывает широкие возможности создания новых эффективных препаратов для управления жизнедеятельностью и терапии патологических состояний.

Список использованных источников

- 1. Ribonucleic acid. Part two / Complementary prescriptions, 2011 [Electronic resource]. Mode of access: http://www.cpmedical.net/ribonucleic-acid-part-two. Date of access: 21.01.2012.
- 2. RNA, Ribonucleic acid capsules / Complementary prescriptions, 2011 [Electronic resource]. Mode of access: http://www.cpmedical.net/rna-ribonucleic-acid-capsules.html. Date of access: 21.01 2012.
- 3. Полийчук, Т.П., Амбарцумян, Л.Л., Гома, С.Е. Воздействие препаратов гиалуроновой кислоты и ДНК-РНК комплексов на эластичность кожи для коррекции возрастных изменений кожи / Т.П. Полийчук, Л.Л. Амбарцумян, С.Е. Гома // Национальный сервер дерматологии России [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.dermatology.ru. Дата доступа: 21.01.2012.
- 4. Полудан, Теброфен Герпес / Справочник [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://lekmed.ru/info/arhivy/gerpes_11.html. Дата доступа: 21.01.2012.
- 5. Rathbone, M.P. Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types / M.P. Rathbone [et al.] //

- In Vitro Cell. Dev. Biol. 1992. Vol. 28A. P. 529–536.
- 6. Thellung, S. Polydeoxyribonucleotides enhance the proliferation of human skin fibroblasts: involvement of A2 purinergic receptor subtypes / S. Tellung [et al.] // Life Sci. 1999. Vol. 64. P. 1661–1674.
- 7. Rathbone, M.P. Trophic effects of purines in neurons and glial cells / M.P. Rathbone [et al.] // Prog. Neurobiol. 1999. Vol. 59. P. 663–690.
- 8. Nakamura, E. ATP activates DNA synthesis by acting on P2X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells / E. Nakamura [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2000. Vol. 279. P. 510–519.
- 9. Pickard, M., Kinsella, A. Influence of both salvage and DNA damage response pathways on resistance to chemotherapeutic antimetabolites / M. Pickard, A. Kinsella // Biochem. Pharmacol. 1996. Vol. 52. P. 425–431.
- 10. Chavan, A.J. Interaction of nucleotides with acidic fibroblast growth factor (FGF-1)/A.J. Chavan // Biochemistry. 1994. Vol. 33. P. 7193–7202.

- 11. Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Rathbone, M.P. Extracellular guanosine and guanosine-50-triphosphate increase: NGF synthesis and release from cultured mouse neopallial astrocytes / P.J. Middlemiss, J.W. Gysbers, M.P. Rathbone // Brain Res. 1995. Vol. 677. P. 152–156.
- 12. Valdatta, L. Evaluation of the efficacy of polydeoxyribonucleotides in the healing process of autologous skin graft donor sites: a pilot study / L. Valdatta [et al.] // Curr. Med. Res. Opin. 2004. Vol. 20. P. 403–408.
- 13. Guizzardi, S. Effects of heat deproteinate bone and polynucleotides on bone regeneration: an experimental study on rat / S. Guizzardi [et al.] // Micron. 2007. Vol. 38. P. 722–728.
- 14. Bitto, A. Polydeoxyribonucleotide (PDRN) restores blood flow in an experimental model of peripheral artery occlusive disease / A. Bitto [et al.] // J. Vasc. Surg. 2008. Vol. 48. P. 1292–1300.
- 15. Altavilla, D. Polydeoxyribonucleotide (PDRN): a safe approach to induce therapeutic angiogenesis in peripheral artery occlusive disease and in diabetic foot ulcers / D. Atavilla [et al.] // Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. 2009 Vol. 7. P. 313–321.
- 16. Galeano, M. Polydeoxyribonucleotide stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse / M. Galeano [et al.] // Wound Repair Regen. 2008. Vol. 16 P. 208–217.
- 17. Bitto, A. Polydeoxyribonucleotide improves angiogenesis and wound healing in experimental thermal injury / A. Bitto [et al.] // Crit. Care Med. 2008 Vol. 36 P. 1594–1602.
- 18. Minutoli, L. Effects of polydeoxyribonucleotide on the histological damage and the altered spermatogenesis induced by testicular ischaemia and reperfusion in rats / L. Minutoli [et al.] // Int. J. Androl. 2011. Epub ahead of print.
- 19. Bitto, A. Polydeoxyribonucleotide reduces cytokine production and the severity of collagen-induced arthritis by stimulation of adenosine A (2A) receptor / A. Bito [et al.] // Arthritis Rheum. 2011. Vol. 63. P. 3364–3371.
- 20. Muratore, O. A human placental polydeoxyribonucleotide (PDRN) may promote the growth of human corneal fibroblasts and iris

- pigment epithelial cells in primary culture / O. Muratore [et al.] // New Microbiol. 2003. Vol. 26. P. 13–26.
- 21. Универсальные эффекты применения нуклеиновых кислот / ДИЭНАЙ. Екатеринбург. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.dnaekb.ru/statmain/statmain/110-lib-unnk.html. Дата доступа: 21.01.2012.
- 22. Hemmi, H. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA / H. Hemmi [et al.] // Nature. 2000. Vol. 408. P. 740–745.
- 23. Krieg, A.M. Development of TLR9 agonists for cancer therap. / A.M. Krieg [et al.] // J. Clin. Invest. 2007. Vol. 117. P. 1184–1194.
- 24. Krieg, A.M. Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides / A.M. Krieg // Curr. Oncol. Rep. 2004. Vol. 6. P. 88–95.
- 25. Manegold, C. Addition of PF-3512676 (CpG 7909) to a taxane/platinum regimen for first-line treatment of unresectable non-small cell lung cancer (NSCLC) improves objective response phase II clinical trial / C. Manegold [et al.] // Eur. J. Cancer. 2005. Vol. 3. P. 326.
- 26. Toll-like receptor / Wikipedia, 2012 [Electronic resource]. Mode of access: http://en.wikipedia.org/wiki/Toll-like_receptor. Date of access: 21.01.2012.
- 27. Takaoka, A. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response / A. Takaoka [et al.] // Nature. 2007. Vol. 448. P. 501–505.
- 28. Hägele, H. Double-stranded DNA activates glomerular endothelial cells and en-hances albumin permeability via a toll-like receptor-independent cytosolic DNA recognition pathway / H. Hägele [et al.] // Am. J. Pathol. 2009. Vol. 175. P. 1896–1904.
- 29. Allam, R. Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells / R. Allam [et al.] // J. Am. Soc. Nephrol. 2009. Vol. 20. P. 1986–1996.
- 30. Wang, Z. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules / Z. Wang [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. P. 5477–5482.
- 31. Antisense therapy / Wikipedia, 2011 [Electronic resource]. Mode of access: http://en.wikipedia.org/wiki/Antisense therapy. –

- Date of access: 21.01.2012.
- 32. Таргетная терапия / Российский онкологический портал, 2011 [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.rosoncoweb.ru/library/8th_conf/18.htm. Дата доступа: 21.01.2012.
- 33. Бычков, М.В., Большакова, С.А., Бычков, Ю.М. Современная химиотерапия неметкоклеточного рака легкого / М.В. Бычков, С.А. Большакова, Ю.М. Бычков // Медицинская газета «Здоровье Украины» [Электронный ресурс]. 2004. №88. Режим доступа: http://www.health-ua.com/articles/555.html. Дата доступа: 21.01.2012.
- 34. Kim, V.N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function / V.N. Kim // Molecules and Cells. 2005. Vol. 19, №1. P. 1–15.
- 35. Квитко, О.В. Разработка клеточных тест-систем для создания полинуклеотидных антираковых препаратов / О.В. Квитко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. 2008. Т. 7. С. 18—24.
- 36. Davis, M.E. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles / M.E. Davis [et al.] // Nature. 2010. Vol. 464. P. 1067–1070.
- 37. Gao, Y., Liu, X.L., Li, X.R. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers / Y. Gao, X.L. Liu, X.R. Li // Int. J. Nanomedicine. 2011. Vol. 6. P. 1017–1025.
- 38. Chang, C.I. Structural diversity repertoire of gene silencing small interfering RNAs / C.I. Chang [et al.] // Nucleic Acid Ther. 2011. Vol. 21. P. 125–131.
- 39. Qiu, S., Adema, C.M., Lane, T. A computational study of off-target effects of RNA interference / S. Qiu, C.M. Adema, T.A. Lane // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33. P. 1834–1847.
- 40. Kvitko, O.V. Hunting the mechanisms of self-renewal of immortal cell populations by means of realtime imaging of living cells / O.V. Kvitko // Cell Biology International. 2005. Vol. 29. P. 1019–1024.
- 41. Квитко, О.В. Разработка методов компьютерной видеомикроскопии живых клеток для медицинской трансплантологии, биотехнологии животных и токсикологии / О.В. Квитко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. 2009. Т. 10. С. 89–100.

- 42. Bagheri, S., Kashani-Sabet, M. Ribozymes in the age of molecular therapeutics / S. Bagheri, M. Kashani-Sabet // Curr. Mol. Med. 2004. Vol. 4. P. 489–506.
- 43. Schubert, S., Kurreck, J. Ribozyme- and deoxyribozyme-strategies for medical applications / S. Scubert, J. Kurreck // Curr. Drug Targets. 2004. Vol. 5. P. 667–681.
- 44. Ribozyme / Wikipedia, 2012 [Electronic resource]. Mode of access: http://en.wikipedia.org/wiki/Ribozyme. Date of access: 21.01.2012.
- 45. Kruger, K. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena / K. Kruger [et al.] // Cell 1982. Vol. 31. P. 147–157.
- 46. De Feyter, R., Li, P. Technology evaluation: HIV ribozyme gene therapy, Gene Shears Pty Ltd. / R. de Feyter, P. Li // Curr. Opin. Mol. Ther. 2000. Vol. 2. P. 332–335.
- 47. Grimpe, B. Deoxyribozymes: new therapeutics to treat central nervous system disorders / B. Grimpe // Front. Mol. Neurosci. 2011. Vol. 4. N. 25. Epub. 2011 Sep 23.
- 48. Santoro, S.W., Joyce, G.F. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme / S.W. Santoro, G.F. Joyce // Biochemistry. 1998. Vol. 37. P. 13 330–13 342.
- 49. Achenbachm, J.C. DNAzymes: from creation *in vitro* to application *in vivo* / J.C. Achenbachm [et al.] // Curr. Pharm. Biotechnol. 2004. Vol. 5 P. 321–336.
- 50. Silverman, S.K. Survey and summary: *in vitro* selection, characterization and application of deoxyribozymes that cleave RNA / S.K. Silverman // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33 P. 6151–6163.
- 51. Geyer, C.R., Sen, D. Evidence for the metalcofactor independence of an RNA phosphodiester-cleaving DNA enzyme / C.R. Geyer, D. Sen // Chem. Biol. 1997. Vol. 4. P. 579–593.
- 52. Roth, A., Breaker, R.D. An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. / A. Roth, R.D. Breaker // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998. Vol. 95. P. 6027–6031.
- 53. Akhtar, M. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway

- M. Akhtar [et al.] // FASEB J. 2003. Vol. 10. P. 1319–1321.
- 54. Sheyhidin, I. Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma / I. Sheyhidin // World J. Gastroenterol. 2011. Vol. 17. P. 3745–3751.
- 55. Liang, X. Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells / X. Liang [et al.] //
- Blood. 2010. Vol. 115. P. 5041-5052.
- 56. Квитко, О.В., Жукова, Л.Н., Конева, И.И. Антираковый эффект экзогенных нуклеиновых кислот / О.В. Квитко, Л.Н. Жукова, И.И. Конева // Доклады АН Беларуси. 1992. Т. 36. С. 652—655.
- 57. Yakubov, L.A. Natural human gene correction by small extracellular genomic DNA fragments / L.A. Yakubobov [et al.] // Cell Cycle. 2007. Vol. 6. P. 2293–2301.

Дата поступления статьи 19 декабря 2011 г.

РЕФЕРАТЫ

SUMMARIES

УЛК 633.521:631.523

Гузенко, Е.В. Морфо-генетический полиморфизм популяций льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), сформированных на основе ложных трансформантов / Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш, М.В. Богданова // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 7–18

В работе представлена характеристика четырех популяций льна-долгунца (V-1, V-2, V-3, B-1), созданных на основе ложных трансформантов (англ. "escapes"), приспособившихся к существованию на селективной среде, но не содержащих чужеродной ДНК (R0). Методом SSR-анализа выявлены изменения в геноме растений-регенерантов первого поколения. Полиморфизм микросателлитной ДНК установлен по локусам Lu13, Lu23, что свидетельствует о расширении генетической базы льна-дролгунца. Результаты второго года полевых испытаний созданных популяций показали достоверное увеличение средних значений показателей «общая высота растения», «техническая длина» для популяций V-1, V-2, B-1, «число коробочек» для популяций V-1, V-2, V-3, «число семян» для популяций V-2, B-1 по сравнению с соответствующими группами контрольных растений. Снижение вариации морфологических признаков в популяциях растений поколения R2 как по сравнению с первым годом полевых испытаний популяций, так и по сравнению с исходными сортами свидетельствует о постепенной стабилизации признаков и выравнивании материала. Созданные растения уникальны и могут служить основой для создания новых сортов.

Ключевые слова: лен-долгунец (Linum Usitatissimum L.), ложные трансформанты, растениярегенеранты, SSR-анализ.

Guzenko, Ye. Morphogenetic polymorphism of fiber flax population (*Linum Usitatissimum* L.) created on the base of "escapes" / Ye. Guzenko, V. Lemesh, M. Bogdanova // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 7–18.

In article was analyzed the characteristic of four fiber flax populations (V-1, V-2, V-3, B-1) created on the basis of "escapes" and adapted to existence on selective medium but not containing a foreign DNA (R0). The variations in genome of first generation regenerant plants were studied by SSR-analysis. Polymorphism of microsatellite DNA was determined by Lu13, Lu23 locuses that indicate the expansion of genetic basis of fiber flax. Results of second year field tests of created populations showed increase of the average of "total plant's height", "technical length" to populations V-1, V-2, B-1, "number of bolls" to populations V-1, V-2, V-3, "number of seeds" to populations V-2, B-1 comparing with appropriated groups of control plants. Decrease of variation of morphological signs in plant populations of R2 gereneration as on comparison with the first year of the field test of populations and as on comparison with initial cultivar testifies of permanent stabilization of factors and smoothing of material. Created plants are unique and can serve as basis for creation new varieties. *Key words:* fiber flax (*Linum Usitatissimum* L.), "escapes", SSR-analysis.

УДК 577.21:796

Сравнение генотипов спортсменов разной специализации по комплексу генов спортивной успешности / И.Б. Моссэ [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 19–24. – Соавт: А.Л. Гончар, К.В. Жур, Н.И. Моссэ, Л.А. Кундас, Н.И. Бышнёв, П.Н. Малашевич, А.В. Семеняков

Проведено молекулярно-генетическое тестирование образцов ДНК членов олимпийских и национальных команд Беларуси по биатлону, хоккею и теннису как потенциальных носителей генотипов, наиболее благоприятных для этих видов спорта. Проанализированы полиморфные

варианты генов HIF1, ACE, eNOS, VEGF, PAI-1, MB и PPARG. У представителей разных видов спорта выявлены различные редкие варианты генов, существенно повышающих физическую выносливость или скоростно-силовые способности. Эти редкие полиморфные варианты могут быть использованы для разработки программ отбора начинающих спортсменов.

Ключевые слова: спорт, ДНК-тестирование, комплекс генов, спринтеры, стайеры, биатлон, хоккей, теннис.

A genotype comparison of different specialization sportsmen by sport gene complex / I. Mosse [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 19–24. – A. Gonchar, K. Zhur, N. Mosse, L. Kundas, N. Byshney, P. Malashevich, A. Semenyakov

Molecular-genetic DNA analysis of the members from some Olympic and National teams of Belarus (on biathlon, hockey, tennis) was performed for revealing genetic factors giving rise to the highest endurance or power and velocity. Polymorphisms in *HIF1*, *ACE*, *eNOS*, *PAI-1*, *VEGF*, *MB*, *PPARG* genes were studied. The frequencies of allelic variants defining increased functional activity of some genes in high-skill sportsmen were shown to exceed mean values, typical for the persons not playing sport. Some distinctions in genotypes of athletes playing different sports were revealed. Rare genetic alleles discovered in high-skill sportsmen can be used for young sportsmen selection program elaboration.

Key words: sport, DNA-certification, complex of genes, sprinter, long-distance runner, biathlon, hockey, tennis.

УДК 577.21:635.21

Кондратюк, А.В. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов сортов картофеля белорусской и иностранной селекции / А.В. Кондратюк, А.В. Кильчевский, Е.И. Кузьминова // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 25–29

В статье представлены результаты исследования полиморфизма 20 сортов белорусской и иностранной селекции по 12 SSR-локусам. Идентифицирован спектр аллелей каждого исследованного локуса, а также определены частоты встречаемости выявленных аллельных фенотипов. Для каждого исследованного сорта установлена аллельная SSR-формула, которая может быть использована в качестве молекулярно-генетического паспорта.

Ключевые слова: картофель, SSR-маркеры, ДНК-паспорт.

Kandratiuk, A. Analysis of microsatellite locus polymorphism in potato cultivars of Belarusian and foreign breeding / A. Kandratiuk, A. Kilchevsky, E. Kusminova // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 25–29

Polymorphism of microsatellite loci of the nuclear genome was examined in 20 potato cultivars of belarusian and foreign breeding. Polymorphism of the selected SSR loci was characterized, and prevailing, as well as unique SSR allele phenotypes were described. Based on the microsatellite loci analyzed, for each of the cultivars examined, its allele formula was established.

Key words: potato, SSR markers, DNA passport.

УДК 577.21:636.23.082.2

Белая, Е.В. Оценка индивидуального фенотипического эффекта полиморфных вариантов генов гипофизарного фактора роста-1 (*bPit-1*) и инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*) на признаки молочной продуктивности у черно-пестрого голштинизированного крупного рогатого скота / Е.В. Белая, М.Е. Михайлова, Н.В. Батин // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 30–35

Исследованы индивидуальные фенотипические эффекты HinFI-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста-1(bPit-1) и SnaBI-полиморфизма гена инсулиноподобного фактора роста-1(bIGF-1) на признаки молочной продуктивности у черно-пестрого голштинизирован-

ного крупного рогатого скота. Представлен принципиально новый подход к оценке перспективности применения полиморфных вариантов генов-кандидатов в качестве генетических маркеров повышенной молочной продуктивности, предполагающий оценку фенотипического эффекта полиморфизма путем сравнения показателей продуктивности животных с соответствующими генотипами по данному признаку по отношению к показателям продуктивности общей выборки.

Ключевые слова: гипофизарный фактор роста-1, инсулиноподобный фактор роста-1, генетический маркер, повышающий фенотипический эффект, понижающий фенотипический эффект, молочная продуктивность, крупный рогатый скот.

Belaya, E. Estimation of the individual phenotypic effects of polymorphic variants of hypophysial growth factor (*bPit-1*) and of insulin-like growth factor-1 (*bIGF-1*) genes on milk productivity traits in cattle of Holstein and Black-and-white breeds / E. Belaya, M. Mikhailova, N. Batin // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 30–35

Individual phenotypic effects of HinFI-polimorphism of hypophysial growth factor gene (*bPit-1*) and SnaBI-gene polymorphism of insuline-like growth factor-1 (*bIGF-1*) on milk productivity traits in cattle of Holstein and Black-and-white breeds were revealed. The article presents a new approach to estimation of availabity of using polymorphic variants of genes that are candidates as genetic markers of high milk productivity. This approach intended the estimation of phenotypic effect of polymorphism by comparison of the rate of milk productivity and corresponding genotypes to the general random productivity.

Key words: hypophysial growth factor-1, insuline-like growth factor-1, genetic marker, heightening phenotypic effect, decreasing phenotypic effect, milk productivity, cattle.

УДК 577.21:636.234.1.082.2

Белая, Е.В. Комбинированные фенотипические эффекты полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bPrl*, *bGH*, *bGHR* и *bIGF-1*) на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы / Е.В. Белая, М.Е. Михайлова, Н.В. Батин // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2011. – С. 36–43

Исследованы HinFI- и StuI-полиморфизмы гена гипофизарного фактора-1 (bPit-1), RsaI-полиморфизм гена пролактина (bPrl), AluI-полиморфизм гена гормона роста (bGH), SspI-полиморфизм гена рецептора гормона роста (bGHR) и SnaBI-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста-1 (bIGF-1). Приведены данные, описывающие их комбинированные эффекты на признаки молочной продуктивности у коров голштинской породы. Отмечаются закономерности участия индивидуальных полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада в формировании совокупных фенотипических эффектов диплотипов.

Ключевые слова: гипофизарный фактор роста-1, пролактин, гормон роста, рецептор гормона роста, инсулиноподобный фактор роста-1, генетический маркер, комбинированный фенотипический эффект, диплотипы, молочная продуктивность, крупный рогатый скот.

Belaya, E. Combined phenotypic effects of polymorphic gene variants of somatotropin cascade (*bPit-1*, *bPrl*, *bGH*, *Bghr* and *b1GF-1*) on milk productivity traits in cattle of Holstein breed / E. Belaya, M. Mikhailova, N. Batin // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 36–43

The HinFI- and Stul-polimorphisms gene of the hypophysial growth factor-1 (bPit-1), RsaI-polymorphism of the prolactin gene (*bPrI*), AluI- polymorphism of the growth hormone gene (*bGH*), SspI-polymorphism of the growth hormone receptor (*bGHR*) and SnaBI-polymorphism of the insulin-like growth factor-1 (*bIGF-1*) were studied. Were given data that describe their combined effects on milk productivity traits in cattle of Holstein breed. It was noted the regularity of take part of individual polymorphic gene variants of somatotropin cascade in the formation of complex phenotypic diplotype effects.

УДК 575.234.2:633.14

Генетические эффекты дупликации генома у озимой ржи (Secale cereale L.) / И.С. Гордей [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 44–54. – Соавт.: Н.Б. Белько, И.С. Щетько, И.А. Гордей

Изложены результаты исследования с использованием современных цитогенетических и молекулярно-генетических методов генетических эффектов дупликации генома у аутотетраплоидов озимой ржи, созданных на основе диплоидных сортов и гибридов при полиплоидизации растений закисью азота (N_2O). Показано, что генетические эффекты дупликации генома у озимой ржи проявляются на клеточном, хромосомном, белковом и ДНК уровнях. Дупликация генома у ржи приводит к нарушению сбалансированной у диплоидов генетической системы регуляции мейоза (sy1, sy9 sy10, sy18, sy19), появлению анеуплоидов в потомстве аутотетраплоидов, изменению экспрессии генов видоспецифических запасных белков семян (секалинов) и к структурным изменениям ДНК.

Ключевые слова: рожь, полиплоидия, дупликация генома, анеуплоидия, мейоз, кариотипирование, полиморфизм, ПЦР-анализ, электрофорез.

Genetic effects of duplication genome in winter rye (*Secale cereale* L.) / I.S. Gordey [et. al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 44–54. – N. Belko, I. Shetko, I Gordey

In this article the results of research of genetic effects of duplication genome in autotetraploids of winter rye are stated. The results were obtained with use of modern cytogenetic and molecular-genetic methods. The new autotetraploids of winter rye were developed by nitous oxide (N₂O). In this article the main genetic effects of duplication genome at cellular, chromosomal, protein and DNA levels are shown. Duplication of genome winter rye leads to infringement of balanced genetic system of regulation meiosis, to occure aneuploids, to change of an expression some genes of specific proteins (secalins) and to structural changes of DNA.

Key words: rye, polyploidy, duplication of genome, aneuploidy, meiosis, karyotyping, polymorphism, PCR-analysis, electrophoresis.

УДК: 631.575.222.72: 635.21

Характеристика гибридов между 2 EBN видом-посредником *Solanum verrucosum* и 1 EBN диплоидными видами картофеля / Ю.В. Полюхович [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13 – Минск, 2012. – С. 55–63. – Соавт.: Е.В. Воронкова, А.В. Савчук, А.П. Ермишин

В статье представлены результаты изучения ряда морфологических и селекционных показателей гибридов между 2 EBN самосовместимым видом картофеля *S. verrucosum* и 1 EBN диплоидными видами *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum*, *S. polyadenium*, *S. commersonii* и *S. circaeifolium*. На ранних стадиях развития сеянцы гибридов по внешнему виду были ближе к *S. verrucosum*, по интенсивности роста они значительно превосходили родительские формы. На стадии цветения среди гибридов наблюдалось расщепление по окраске цветка и функциональной фертильности пыльцы. Для межвидовых гибридов, как и родительских видов, была характерна пониженная способность к клубнеобразованию в условиях Беларуси. Были получены ягоды и выполненные семена при опылении смесью пыльцы дигаплоидов *S. tuberosum* практически всех межвидовых гибридов, что говорит о том, что гибриды имели 2 EBN. Гибридность ряда сеянцев *S. verrucosum* × *S. bulbocastanum* подтверждена с помощью RAPD-анализа, среди них выявлены формы, несущие SCAR маркер RGA2 гена устойчивости к фитофторозу *Rpi-blb1*.

Ключевые слова: картофель, межвидовая гибридизация, балансовое число эндосперма, *Solanum verrucosum*, 1 EBN диплоидные виды.

Characteristics of hybrids between 2 EBN bridge-species *Solanum verrucosum* and 1 EBN diploid potato species / Yu. Polyukhovich [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 55–63. – E. Voronkova, A. Savchuk, A. Yermishin

The results are presented in the paper on studying morphological and breeding parameters of hybrids between 2 EBN self-compatible potato species *S. verrucosum* and 1 EBN diploid species *S. bulbocastanum, S. pinnatisectum, S. polyadenium, S. commersonii, S. circaeifolium.* The hybrid seedlings were closer to *S. verrucosum* in appearance at the early stages of development, they surpassed parental forms in growth activity. Segregation took place among hybrids on corolla color and functional pollen fertility on the stage of flowering. The hybrids as well as parental species had reduced tuber formation in climate conditions of Belarus. Berries and plump seeds have been obtained as a result of pollination almost all of the hybrids with mix of pollen of *S. tuberosum* dihaploids. This means that the hybrids had 2 EBN. Hybridity of the set of *S. verrucosum*×*S. bulbocastanum* seedlings has been confirmed by means of RAPD-analysis. The forms carrying SCAR-marker RGA2 of *Rpi-blb1* gene of resistance to late blight have been revealed among these hybrids.

Key words: potato, interspecific hybridization, endosperm balance number, *Solanum verrucosum*, 1 EBN diploid species.

УДК 577.21:597.551.2

Ровба, Е.А. Оценка генетического разнообразия пород карпа белорусской селекции с помощью микросателлитных маркеров / Е.А. Ровба, О.Ю.Конева, С.Е. Дромашко // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 64–73

В статье рассматриваются результаты исследования полиморфизма ДНК пород карпа белорусской селекции с использованием микросателлитных маркеров MFW16, MFW7, MFW28, MFW31. Показано, что микросателлитные маркеры дают некоторую информацию о генетическом своеобразии отдельных отводок (лахвинская чешуйчатая, тремлянская зеркальная, изобелинская «Столин XVIII»), но оказываются малоэффективными для целей их паспортизации.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, карп (*Cyprinus carpio* L.), породы белорусской селекции, микросателлитные маркеры.

Rouba, E. Estimation of genetic diversity for Belarusian carp breeds using microsatellite markers / E. Rouba, A. Koneva, S. Dromashko // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 64–73

The article deals with a study of DNA polymorphism of Belarusian carp breeds using microsatellite markers MFW16, MFW7, MFW28, MFW31. It is shown that microsatellite markers provide information on the genetic distinctiveness of some sub-breed variants (lahvinskaya scaly, tremlyanskaya mirror, izobelinskaya «Stolin XVIII»), but are ineffective for the purpose of their certification.

Key words: genetic diversity, carp (Cyprinus carpio L.), Belarusian breeds, microsatellite markers.

УДК 575.224.46:577.2.08

Савина, Н.В. Параметры нормального ответа лимфоцитов на повреждения ДНК: референтные интервалы / Н.В. Савина, Т.Д. Кужир // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 74–81

Представлены данные изучения целостности и стабильности генома в группе из 172 здоровых жителей Беларуси в соответствии с разработанной технологией диагностики геномной нестабильности. В лимфоцитах периферической крови оценены уровни эндогенных/фоновых повреждений ДНК, повреждений, индуцированных пероксидом водорода, кинетика и эффективность репарации ДНК за 3-часовой период инкубации лимфоцитов после мутагенной обработки. На основании непараметрических критериев (10-й и 90-й процентиль) определены референтные интервалы, соответствующие норме для каждого показателя. Приведены примеры использования технологии для оценки состояния генома у лиц из разных групп риска.

Ключевые слова: повреждения ДНК, репарация ДНК, лимфоциты, метод ДНК-комет, референтный интервал.

Savina, N. Parameters of a normal DNA damage response in lymphocytes: reference ranges / N. Savina, T. Kuzhir // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 74–81

The data of studying genome integrity and stability in the group of 172 healthy residents of Belarus according to the developed technology of genome instability diagnostics are presented. In peripheral blood lymphocytes, the levels of endogenous/background DNA damage, hydrogen peroxide-induced damage, DNA repair kinetics and efficiency for a 3 h period of treated lymphocyte incubation after mutagenic processing were estimated. Based on non-parametric criterions, namely 10th and 90th percentiles, the reference (normal) ranges for each index were detected. Examples of the proposed technology usage for evaluating genome integrity in individuals from different risk groups are presented.

Key words: DNA damage, DNA repair, lymphocytes, Comet-assay, a reference range.

УЛК: 635.21: 631.539: 631.527.3: 631.524.86: 577.21

Оценка первичных дигаплоидов *S. tuberosum* на наличие генов устойчивости к болезням и вредителям методом ПЦР-анализа / В.И. Лукша [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 82–87. – Соавт.: Е.В. Воронкова, О.Н. Гукасян, А.П Ермишин

В статье представлены результаты оценки коллекции из 55 первичных дигаплоидов картофеля, полученных на основе тетраплоидных сортов *S.tuberosum* и межвидовых гибридов на наличие генов вертикальной устойчивости к ряду наиболее значимых в Беларуси болезней и вредителей картофеля (цистообразующая нематода *Globodera rostochiensis*, вирусы PVY, PVX, PLRV, рак и фитофтороз). Для оценки использовали девять ПЦР-маркеров к доминантным аллелям 9 генов различного происхождения. В результате анализа в коллекции выявлены первичные дигаплоиды, несущие одновременно до 7 генов устойчивости к различным патогенам. Такое высокое содержание R-генов позволит в дальнейшем эффективно использовать их в качестве культурной основы при создании исходного материала для селекции картофеля на диплоидном уровне с целью придания ему комплексной устойчивости к болезням и вредителям и, в перспективе, для получения новых сортов с устойчивостью к широкому спектру патогенов.

Ключевые слова: картофель, *Solanum tuberosum*, первичные дигаплоиды, R-гены, ПЦР-анализ, маркер-сопутствующая селекция, селекция картофеля на диплоидном уровне.

Estimation *S. tuberosum* primary dihaploids on possession of disease and pest resistance genes by means of PCR analysis / V. Luksha [et. al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 82–87. – E. Voronkova, O. Gukasian, A. Yermishin

The results of the PCR-analysis of 55 primary dihaploids from tetraploid varieties *S.tuberosum* and interspecies hybrids are presented. The aim of the analysis was the selection of genotypes with resistance genes to globoderose it caused by *Globodera rostochiensis*, to X, Y and leaf roll potato viruses, to potato wart and light blight. For analysis realization have been used 9 PCR-markers to dominant alleles of 9 R-genes from different sources. As a result it was selected some clones with the presence simultaneously more then 7 R-genes to different pathogens. High content of R-genes make a prospects of effective utilization such genotypes us a cultivate base for potato resistance breeding on diploid level with a distant aim of varieties breeding with a resistance to a broad spectrum of pathogens.

Key words: potato, *Solanum tuberosum*, primary dihaploids, R-genes, PCR-analysis, marker assisted breeding, potato breeding on diploid level.

УДК 634.11:631.524.86

Ассоциация аллеля *MdMYB1-1* с красной окраской кожицы плодов яблони / О.Ю. Урбанович [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 88–94. – Соавт.: З.А. Козловская, П.В. Кузмицкая, Н.А. Картель

Цвет плодов яблони является важным критерием, который влияет на выбор потребителем того или иного сорта. Красный цвет плодов яблони главным образом определяется присутствием вторичных метаболитов антоцианов, синтез которых индуцируется солнечным светом. Антоцианы синтезируются по флавоноидному пути, основная регуляция которого происходит на уровне транскрипции структурных генов, кодирующих ферменты. Геном яблони содержит по крайней мере три аллеля транскрипционных факторов МҮВ, один из которых, МаМУВ1-1 присутствовал у растений с красной окраской плодов, в то время как два других (MdMYB1-2 и MdMYB1-3) были выявлены в геноме растений, не имеющих красной окраски плодов. Целью данного исследования являлось определение аллельного состава гена MdMYB1 у сортов яблони различной окраски и анализ возможности использования информации о составе аллелей данного гена для прогнозирования окраски кожицы плодов. В исследовании были использованы сорта, произрастающие в данном климатическом регионе. Результаты показали довольно высокую степень ассоциации, а также присутствие аллеля MdMYB1-1 у всех яблонь с наиболее интенсивной окраской, хотя его присутствие и не гарантирует наличие пигмента. Полученные данные указывают на то, что помимо аллельного состава МdMYB1, на рассматриваемый признак оказывают влияние и другие факторы.

Ключевые слова: яблоня, антоцианы, ген *MdMYB1*, маркер, сопутствующая селекция.

Association *MdMYB1-1* allele with apple fruit skin color / O. Urbanovich [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 88–94. – P. Kuzmitskaya, Z. Kozlovskaya, N. Kartel

A color of apple fruit skin is an important criterion which determines a consumer's choice. A red color of apple fruit skin is due to secondary metabolites – anthocyanins whose synthesis is induced by the sunlight. Anthocyanins are synthesized in a flavonoid pathway, a major regulation of which occurs at the transcription level of structural genes encoding enzymes. Apple genome contains three alleles of transcription factor MYB1 one of which, *MdMYB1-1* was present in plants with a red color of fruit skin while the other two (*MdMYB1-2* and *MdMYB1-3*) were revealed in genome of plants without a red color of fruit skin. The aim of the present research was to determine the possibility of the given alleles to act as a selection criterion in breeding programs of Belarus. The results have shown a rather high degree of association as well as the presence of the allele *MdMYB1-1* in all apples with the most intensive color though its presence does not assure the existence of pigment. The data obtained point to the fact that besides the allelic composition of *MdMYB1* other factors affect the trait under consideration.

Key words: apple, anthocyanin, MdMYB1 gene, marker-assisted selection.

УДК 631.524.86:633.111:632.4

Изучение донорских свойств у группы сортов мягкой пшеницы — источников устойчивости к *Septoria nodorum* Berk. / А.А. Булойчик [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. — Т. 13. — Минск, 2012. — С. 95—99. — Соавт.: Е.А. Волуевич, В.С. Борзяк

Изучение наследования проростковой устойчивости к Septoria nodorum у 8 яровых и 18 озимых сортов мягкой пшеницы показало, что более эффективными донорами этого признака являются сорта Burgas 2, Jamhill, Flex, Hand, Sage, Coker 47-27 и Fiume. Озимые сорта Burgas 2 и Jamhill имеют по одному ювенильному рецессивному гену. Устойчивость яровых сортов Coker 47-27, Fiume и озимых сортов Flex, Hand, Sage контролируется двумя рецессивными комплементарными генами. Остальные исследованные яровые сорта (Coastal, Cotipora, Frondoso, Mara, Toropi, ИЛ-1) и озимые сортообразцы (Carifen 12, Coker 68-8, Harvest Queen, HC, Neuzuchtung, Redhart, Transfer, Disponent, Moro, Oenus, Wiehenstephan 625/65, Заря, PI 525450) обладают 3-4 генами устойчивости, проявляющими сложное взаимодействие.

Ключевые слова: пшеница, септориоз, устойчивость, наследование.

Study of donor properties of common wheat cultivars that are source of resistance to *Septoria nodorum* Berk. / A. Buloichik [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 95-99. – E. Voluevich, V. Borzyak

Study of inheritance seedling resistance to *Septoria nodorum* Berk of 8 common spring wheat and 18 common winter wheat demonstrated that more efficient donors of this traits are cultivars Burgas 2, Jamhill, Flex, Hand, Sage, Coker 47-27 and Fiume. Winter accessions – Burgas 2 and Jamhill have only recessive juvenile gene. The resistance of spring cultivars Coker 47-27, Fiume and winter crops Flex, Hand, Sage is controlled by two complementary recessive genes. The rest of studied spring crops cultivars (Coastal, Cotipora, Frondoso, Mara, Toropi, IL-1) and samples of winter cultivars (Carifen 12, Coker 68-8, Harvest Queen, HC, Neuzuchtung, Redhart, Transfer, Disponent, Moro, Oenus, Wiehenstephan 625/65, Zarya, PI 525450) have 3-4 resistance genes with complex interaction. *Key words:* wheat, glume blotch, resistance, inheritance.

УДК 577.21:616.71 – 007.234-07

Молекулярно-генетические механизмы предрасположенности к остеопорозу / П.М. Морозик [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 100–109. – Соавт.: И.Б. Моссэ, М.Д. Амельянович, Э.В. Руденко, В. Алекна, М. Тамулайтене Остеопороз – системное заболевание скелета, характеризующееся снижением костной массы и микроархитектурными повреждениями костной ткани, которые ведут к увеличению хрупкости кости и повышению риска переломов. Гомеостаз костной ткани в течение жизни поддерживается преимущественно сбалансированностью процессов костной резорбции и костеобразования, являющихся результатом совместного действия множества генов и средовых факторов. Идентификация генных вариантов, ответственных за предрасположенность к этому заболеванию, позволит сформировать группы риска и проводить наиболее эффективные меры профилактики, диагностики и лечения таких больных, что позволит избежать осложнений и снизить смертность и инвалидизацию.

Ключевые слова: остеопороз, предрасположенность, профилактика, гены-кандидаты.

Molecular and genetic mechanisms of predisposition to osteoporosis / P. Marozik [et. al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 100–109. – I. Mosse, M. Ameliyanovich, E. Rudenko, V. Alekna, M. Tamulaitienė

Osteoporosis is a systemic metabolic disease of the skeleton, characterized by decreased bone mass and micro damages of bone tissue that leads to an increased risk of fracture. Homeostasis of bone tissue during lifetime is maintained mainly by balanced processes of bone resorption and formation, controlled by a large quantity of genes and environmental factors. The identification of genes variants, responsible for predisposition to this disease, will help to form groups of risk and to perform the most effective measures of prevention, diagnostics and therapy of such patients, which will allow avoiding complications and decrease mortality and disability.

Key words: osteoporosis, predisposition, prevention, candidate genes.

УДК 577.21:597.442:575.17

Молекулярно-генетические исследования производителей стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) / М.И. Лесюк [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 110–117. – Соавт.: О.Ю. Конева, Е.А. Ровба, А.М. Слуквин

Целью настоящей работы являлась популяционная идентификация производителей стерляди, выращенных в прудах ОАО «Рыбхоз "Полесье"», путем проведения молекулярно-генетического анализа по четырем микросателлитным локусам (LS-68, LS-19, LS-39, Aox-45) с использованием микросателлитного метода. Подтверждено днестровско-днепровское происхождение стерляди в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области. Обнаружены специфические аллели для днестровско-днепровской стерляди.

Kлючевые слова: стерлядь (Acipenser ruthenus L.), микросателлитные локусы.

Molecular and genetic studies in population of sterlet spawners / M. Lesyk [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 110–117. – O. Koneva, E. Rouba, A. Slukvin

The purpose of this study was to identify population of sterlet, were reared in ponds of fish-farm «Palesye», through molecular-genetic analysis of four microsatellite loci (LS-68, LS-19, LS-39, Aox-45), using microsatellite method. Dniester and Dnieper origin was confirmed by sterlet from fish farm «Palesye» (Pinsk district, Brest region, Belarus). Specific alleles were found for Dniester and Dnieper population of sterlet.

Key words: sterlet (Acipenser ruthenus L.), microsatellite loci.

УДК 616-006.48:615.28

Спонтанная иммортализация фибробластов крысы при длительном культивировании *in vitro* / А.С. Сапун [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 118–125. – Соавт.: О.В. Квитко, И.И. Конева, Я.И. Шейко, Н.А. Балашенко, С.Е. Дромашко Механизмы иммортализации и онкотрансформации во многом еще не изучены, не выявлены причины преодоления клеточного старения и приобретения способности к неограниченной пролиферации *in vitro*. Частота спонтанной трансформации в клеточных культурах грызунов гораздо выше, чем при культивировании клеток человека. Таким образом, исследование эмбриональных фибробластов крысы в течение длительного культивирования является перспективной моделью для изучения всей последовательности событий раковой трансформации *in vitro*. Применение метода компьютерной видеомикросокпии позволило выявить основные стадии иммортализации для клеточных культур, полученных из 12-14-дневных эмбрионов крысы. Показано, что морфологически измененные (округлые) клетки с неограниченным пролиферативным потенциалом возникают на стадии культивирования, предшествующей утрате пролиферации основной клеточной популяцией, представленной веретеновидной формы.

Ключевые слова: иммортализация, онкотрасформация, фибробласты крысы, компьютерная видеомикроскопия.

Spontaneous immortalization of rat fibroblasts during prolonged cultivation *in vitro* / A. Sapun [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 118–125. – O. Kvitko, I. Koneva, Y. Sheiko, N. Balashenko, S. Dromashko

The mechanisms of immortalization and oncotransformation are still largely unknown. The causes of avoiding of cellular aging and the acquisition of unlimited proliferation *in vitro* are not revealed yet. The frequency of spontaneous transformation in the rodent cell cultures is much higher than in human cells. Therefore, culture of embryonic rat fibroblasts is a promising model to study the entire sequence of events of cancer transformation *in vitro*. Application of computer videomicroscopy revealed the main stages of cell immortalization in the cell cultures from 12-14-day rat embryos. It is shown that cells with changed morphology (round shape) with an unlimited proliferation potential arise before the loss of proliferation by the major part of cell population represented by spindle-shaped cells.

Key words: immortalization, oncotransformation, rat fibroblasts, computer videomicroscopy.

УДК 616-006.88:599

Биологические эффекты экзогенных полинуклеотидов и перспективы их использования в медицине (обзорная статья) / О.В. Квитко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 13. – Минск, 2012. – С. 126–135. – Соавт.: А.С. Сапун, И.И. Конева, Я.И. Шейко, Н.А. Балашенко, С.Е. Дромашко

Открытие процесса генетической трансформации посредством введения экзогенного генетического материала в клетку с его последующей экспрессией по механизму матрич-

ного синтеза в соответствии с классической схемой ДНК – РНК – белок явилось стимулом для разработки полинуклеотидных препаратов в медицине. Первые успехи в этом направлении, в частности, данные об иммуностимулирующих и противоопухолевых эффектах, специфических для бактериальной ДНК, обогащенных неметилированными по цитозину динуклеотидами СрG, поставили вопрос о возможности иных, отличающихся от матричного, механизмов биологического действия экзогенных полинуклеотидов. Было установлено, что часть таких «неканонических» механизмов функционирует посредством запуска молекулярных сигнальных путей, начальным пунктом которых является взаимодействие полинуклеотида с рецептором на поверхности или внутри клетки. Обнаружены сигнальные эффекты экзогенных ДНК и РНК, специфичные и неспецифичные в отношении их вторичной структуры (одно- или двунитевые), нуклеотидного состава и последовательности нуклеотидов. Различия рецепторных систем между разными тканями, а также нормальными и опухолевыми клетками, открывают возможность создания полинуклеотидных препаратов, селективно ингибирующих либо стимулирующих пролиферацию разных клеточных типов в терапевтических целях. Рассматриваются перспективы применения каталитических РНК и ДНК – рибозимов и дезоксирибозимов, а также «антисмысловой терапии», основанной на ингибировании трансляции посредством комплементарного спаривания однонитевых рибонуклеотидов с матричной РНК. Кроме того, возрастает интерес к управлению генной экспрессией посредством РНК-интерференции – запускаемой двухцепочечными рибонуклеотидными фрагментами (называемыми малыми интерферирующими РНК) каталитической деградации матричной РНК. Искусственный синтез полинуклеотидов с различными характеристиками предоставляет дополнительные возможности создания биологически активных ДНК- и РНК-препаратов. Для тестирования эффективности полинуклеотидных препаратов in vitro целесообразно использовать видеомикроскопию живых клеток.

Ключевые слова: экзогенные полинуклеотиды, CpG-олигонуклеотиды, AT-районы, полиинозиновая-полицитидиловая кислота, Толл-подобные рецепторы, рибозимы, дезоксирибозимы, антисмысловая терапия, малые интерферирующие РНК, клеточная пролиферация, апоптоз, клеточное старение, полинуклеотидные препараты, мезотерапия, видеомикроскопия живых клеток.

Biological effects of exogenous polynucleotides and prospects for their use in medicine / O.V. Kvitko [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 13. – Minsk, 2012. – P. 126–135. – A.Sapun, I. Koneva, Y. Sheiko, N. Balashenko, S. Dromashko

Discovery of the process of genetic transformation by means of the incorporation into a cell of exogenous genetic material with its subsequent expression due to the mechanism of the template directed synthesis in accordance with the classical scheme DNA-RNA-protein has become a stimulus for the elaboration of polynucleotide preparations in medicine. First successes in this area, in particular, the data on the immune stimulatory and antitumor effects of bacterial DNA rich in unmethylated CpG dinucleotides of cytosine, raised the question of the possible existence of alternative (different from the template directed ones) mechanisms of the biological effects of exogenous polynucleotides. It was revealed that some of such "noncanonical" mechanisms function by launching the molecular signaling pathways the starting point of which is an interaction of a polynucleotide with a receptor on the cell surface or inside the cell. Signaling effects of exogenous DNA and RNA have been found that are specific or nonspecific with respect to their secondary structure (single or double strand), nucleotide composition and nucleotide sequence. Differences of receptor systems in different tissues, as well as normal and tumor cells, provide the opportunity of creation of polynucleotide preparations which inhibit or stimulate selectively the proliferation of different cell types for therapeutic purposes. There are also significant prospects of using catalytic RNAs and DNAs – ribozymes and deoxyribozymes, as well as of "antisense therapy", which is based on the inhibition of translation through complementary pairing of single-stranded RNA from ribonucleotides. Besides, there is an interest to the regulation of gene expression by RNA interference - catalytic degradation of the mRNA triggered by double-stranded ribonucleotide fragments (called small interfering RNA). Artificial synthesis of polynucleotides with different characteristics opens the new possibilities for the creation of biologically active DNA and RNA preparations. Use of the computer videomicroscopy of living cells is an appropriate experimental approach for testing polynucleotide preparations.

Key words: exogenous polynucleotides, CpG-oligonucleotides, AT-regions, polyinosinic-polycyt-idylic acid, Toll-like receptors, ribosymes, deoxyribozymes, antisense therapy, small interference RNAs, cell proliferation, apoptosis, cellular aging, polynucleotide drugs, methotherapy, videomicroscopy of living cells.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ

Статьи должны быть написаны в сжатой и ясной форме и содержать:

- соответствующий индекс универсальной десятичной классификации литературы (УДК);
- название на русском и английском языках;
- инициалы и фамилии авторов на русском и английском языках;
- полное название учреждений, в которых выполнялось исследование и их почтовые адреса;
 - ключевые слова (3...5 слов);
- аннотацию на русском и английском языках (100–150 слов). Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи;
- текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки «введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение»);
- список использованных источников (оформляется в соответствии с Правилами ВАК, Приложение 2);
 - дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10–12 страниц. Последняя страница статьи должна быть заполнена не менее чем на 4/5(!). После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентичного содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на дискете) и на бумажном носителе в 2 экз. В виде отдельного документа представляются краткие сведения о каждом из авторов, включающие фамилию, имя, отчество, год рождения, сведения об образовании, служебные адреса, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность, область научных интересов. Необходимо представить АКТ ЭКСПЕРТИЗЫ о возможности опубликования открытой печати (для статей).

- 1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS-Word. Название файлов фамилия первого автора латинскими буквами.
 - 2. Формат бумаги А4 (297х210 мм), ориентация книжная.
 - 3. Поля: верхнее -2.5 см, нижнее -2.5 см, левое -2.5 см, правое -2.5 см.
- 4. Основной текст статьи набирается шрифтом Times New Roman, размером 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.
 - 5. Автоматическая расстановка переносов обязательна.
- 6. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.
- 7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS-Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).
- 8. Вставка в текст символов (например, β , \in) производится только через опцию «Встав-ка\Символ». Выключку вверх и вниз (C^2 , C_4) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются *курсивом*. Математические формулы (lim, sum, sin, и т.д.) и цифры набираются прямым начертанием.
- 9. Печатать в сложных словах дефис (минерал-индикатор, К-пространство). Тире отбивают с обеих сторон неразрывным пробелом как знак препинания между словами: система «человек машина», «май июнь». Тире между цифрами, напр., 20–30 чел. не отбивается.
- 10. Кавычки по всему тексту должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбивают от заключенных в них слов.

11. При подготовке к печати графиков, блок-схем, диаграмм, файлы должны быть поименованы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и какими по порядку рисунками статьи являются. Графики должны иметь толщину всех линий не менее 0,2 пункта для четкого воспроизведения. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, не допускается использование сканированного текста.

12. Необходимо предоставить электронные файлы фотоматериалов, а также распечатки лазерным принтером всех иллюстраций на листе формата A4. Отсканированные фотоиллюстрации серой, черно-белой цветовой модели должны иметь разрешение 600 dpi и

формат TIFF.

13. Список цитированных источников располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок д.б. написаны внутри квадратных скобок. (напр.: [1]).

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 13

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая* Переводчик *О.А. Лазаренко* Верстка *Е.А. Клевец* Технический редактор *Е.А. Клевец*

Подписано в печать Формат 60х84 1/8 Бумага офсетная. Гарнитура Roman. Печать цифровая. Усл. печ. л. 22,5. Уч.изд. л. 22,7. Тираж 100 экз. Заказ № ИООО «Право и экономика» Лицензия ЛИ №02330/0056831 от 01.04.2004. 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2. Тел.: 284 18 66, 8029 684 18 66 Отпечатано на настольно-издательской системе XEROX в ИООО «Право и экономика» Оригинал-макет подготовлен ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»