

ISSN 1999-9127

Государственное научное учреждение
**«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 11**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2010

УДК [577.21 + 575] (082)

Редакционная коллегия:

А.В. Кильчевский – главный редактор, Л.В. Хотылева – зам. главного редактора;
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенко, 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».

М75 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, 2010. — 133 с. — ISBN 978-985-442-581-8.

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.

Текущий выпуск сборника посвящен, в частности, исследованиям в области ДНК-маркирования сельскохозяйственных растений и животных, отдаленной гибридизации и трансгенеза. Ряд статей посвящен вопросам медицинской генетики.

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

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

ISBN 978-985-442-581-8

© ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси», 2010

СОДЕРЖАНИЕ

<i>В.Ф. Аджиева, Н.А. Некрашевич, С.В. Малышев, О.Г. Бабак, А.В. Кильчевский</i> Сравнительный анализ полиморфизма микросателлитных маркеров генотипов томата (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) белорусской и зарубежной селекции.....	7
<i>А.М. Шишлова, Л.А. Сахно, Б.В. Морзун, Н.В. Кучук, Н.А. Картель</i> Введение кДНК <i>CYP11A1</i> цитохрома P450scс животного происхождения в растения рапса.....	12
<i>О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская, Н.А. Картель</i> Распространение генов устойчивости к мучнистой росе в коллекции сортов и видов яблони, выращиваемых в Беларуси	20
<i>Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич, Л.Ф. Кабашишникова, Г.Е. Савченко</i> Создание генетической коллекции тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов и ее использование в цитогенетических исследованиях	26
<i>Н.В. Савина, М.П. Смаль, Т.Д. Кужир, О.М. Хурс, Т.М. Егорова, А.Д. Политыко, Р.И. Гончарова</i> Оценка состояния генома у потенциальных носителей мутаций, ответственных за синдромы хромосомной нестабильности.....	34
<i>И.Б. Моссэ, А.Л. Гончар, К.В. Жур, М.Д. Амелянович, П.М. Морозик</i> Сравнение популяционных частот генетических факторов риска инфаркта миокарда с уровнями этого заболевания в разных странах Европы.....	45
<i>В.С. Анохина, Л.Н. Каминская, И.Б. Саук, С.В. Петрученя</i> Молекулярно – генетические исследования у люпина (<i>Lupinus</i> L.): создание молекулярных маркеров и генетических карт	54
<i>А.А. Булойчик, В.С. Борзяк, Е.А. Волуевич</i> Частота встречаемости генов вирулентности в белорусских популяциях <i>Ruscinia triticipina</i> Erikss.	68
<i>И.Б. Моссэ, А.Л. Гончар, Л. В. Кухтинская, Н.И. Моссэ, П.Н. Малашевич, А.В. Семеняков</i> Генетические маркеры устойчивости организма к гипоксии.....	74
<i>Т. А. Шарапова, Т. И. Линник, И. Г. Барская, О.Ю. Верлинский, С. Я. Речицкая</i> Интенсивность и распределение рекомбинационных событий в области главного комплекса гистосовместимости у человека	83

<i>Е.В. Белая, М.Е. Михайлова, Н.М. Волчок, Н.И. Тиханович</i> Внутрипородный анализ генетической структуры популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада	92
<i>М.Е. Михайлова, Ю.В. Медведева, Г.Е. Сулимова,</i> Оценка генетической структуры популяции <i>Bison bonasus linnaeus</i> локусам, полученная при сравнении двух методов генетико-популяционного анализа: ISSR-фингерпринтинга и RAPD-анализа	99
<i>Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич,</i> <i>И.Г. Адонина, Е.А. Салина, Л.Ф. Кабашикова, Г.Е. Савченко, Л.М.Абрамчик</i> Создание коллекции хромосомно-замещенных линий гексаплоидных тритикале и ее использование в практической селекции и цитогенетических исследованиях	111
<i>М.Е. Михайлова, Е.В. Белая</i> Влияние <i>HinFI</i> -полиморфизма гена гипофизарного фактора роста <i>bPit-1</i> на признаки молочной продуктивности крупного рогатого скота голштинской и белорусской черно-пестрой пород	120
Рефераты	127
Правила оформления статьи	128

CONTENTS

<i>V. Adzhieva, N. Nekrashevich, S. Malyshev, O. Babak, A. Kilchevsky</i> Comparative analysis of polymorphism of microsatellite markers in tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) genotypes of Belarusian and foreign breeding	7
<i>A. Shishlova, L. Sakhno, B. Morgun, N. Kuchuk, N. Kartel</i> Introduction of cytochrome P450sc CYP11A1 cDNA of animal origin in rapeseed plants.....	12
<i>O. Urbanovich, Z. Kozlovskaya, N. Kartel</i> Spread of mildew resistance genes in the collection of apple cultivars and species grown in Belarus	20
<i>N. Dubovets, Y. Sycheva, L. Solovey, T. Shtyk, Y. Bondarevich, L. Kabashnikova, G. Savchenko</i> Creation of genetic collection from tetraploid wheat-rye amphidiploids and its use in cytogenetic investigations	26
<i>N. Savina, M. Smal, T. Kuzhir, O. Khurs, T. Yegorova, A. Polityko, R. Goncharova</i> Estimation of genome integrity in potential carriers of mutations responsible for chromosome instability syndromes	34
<i>I. Mosse, A. Gonchar, K. Zhur, M. Ameliyanovich, P. Marozik</i> Comparison of population frequencies of myocardial infarction genetic risk factors with this disease levels in different European countries.....	45
<i>V. Anokhina, L. Kaminskaya, I. Sauk, S. Petruchenya</i> Molecular-genetic investigations in <i>Lupinus</i> L.: Development of molecular markers and genetic maps	54
<i>A.A. Bulovich, B.S. Borzyak, E.A. Voluevich</i> The occurrence frequency of virulence genes in Belarusian <i>Puccinia triticina</i> Erikss populations.....	68
<i>I. Mosse, A. Gonchar, L. Kukhtinskaya, N. Mosse, P. Malashevich, A. Semenyakov</i> Genetic markers of organism resistance to hypoxia	74
<i>T. Sharapova, T. Linnik, I. Barskaya, O. Verlinsky, S. Rechitskaya</i> Recombination Intensity and Hot Spot Distribution across Major Histocompatibility Complex.....	83

<i>Ye. Belaya, M. Mikhailova, N. Volchok, N. Tikhanovich</i> Intrabreed analysis of genetic structure in black-and white cattle populations of belarusian breeding for polymorphic gene variants of somatotropin cascade	92
<i>M. Mikhailova, Yu. Medvedeva, G. Sulimova</i> Estimation of a genetic structure of <i>Bison bonasus</i> Linnaeus population obtained by comparing two methods of genetic- population analysis: ISSR-fingerprinting and RAPD-analysis	99
<i>N. Dubovets, Ye. Sycheva, L. Solovey, T. Shtyk, Ye. Bondarevich, I. Adonina, Y. Salina, L. Kabashnikova, G. Savchenko, L. Abramchik</i> Creation of genetic collection of hexaploid triticale chromosome-substitution lines and its use in practical breeding and cytogenetic investigations	111
<i>M. Mikhailova, Ye. Belaya</i> The Influence of HinFI-polymorphism of hypophysial growth factor gene <i>bPit-1</i> on milk productivity traits in cattle of Holstein and Belarusian black-and-white breeds.....	120
Summaries	127
Instructions to authors	128

В.Ф. Аджиева¹, Н.А. Некрашевич², С.В. Малышев², О.Г. Бабак², А.В. Кильчевский²

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОТИПОВ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) БЕЛОРУССКОЙ И ЗАРУБЕЖНОЙ СЕЛЕКЦИИ

¹УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»
Республика Беларусь, 213410, Могилевская обл., г. Горки, ул. Мичурина, 5
²ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Повторы простых последовательностей (Simple Sequence Repeats – SSR) широко распространены в геноме эукариот. Это одна из самых быстро изменяющихся областей генома. Подвергаясь мутациям, эти последовательности мутируют в 1000 раз чаще, чем структурные гены и показывают высокие уровни полиморфизма из-за изменения их длины [1]. Микросателлитные маркеры отличаются генетической стабильностью, высокой воспроизводимостью и кодоминантны, поэтому их часто применяют для паспортизации сортов растений. Как отмечено Veillieux и др. (1995), SSR-анализ – самый простой способ выполнить идентификацию генотипа [2].

Имеются таксономические предпочтения в распространении разных повторов. Так, в геноме растений последовательность (AT)_n отмечена как самый часто повторяющийся динуклеотид, в геноме млекопитающих это (CA)_n повтор [1, 2, 3]. У человека предположительно 50 000 микросателлитных локусов на геном – 1 на 30 тысяч пар оснований, у арабидопсиса –

1 на 430 тысяч пар оснований (в 14 раз реже) [1]. Для культурных сортов томата существует зависимость между длиной повторов и степенью их полиморфизма, которая возрастает с увеличением длины повторов [2].

Для целей идентификации и паспортизации растений необходимо выбирать маркеры, отвечающие ряду требований. В первую очередь они должны быть высокополиморфны, стабильно наследоваться в поколениях, охватывать разные области генома. Этим требованиям отвечают маркеры к микросателлитным последовательностям, или SSR-маркеры. Однако такие маркеры значительно отличаются по информативному содержанию. По данным Грушецкой и др. [4], в их исследовании значение индекса полиморфного информационного содержания колебалось от 0 для маркера SSR48 до 0,753 для TMS22. Поэтому целью нашего исследования являлся сравнительный анализ полиморфизма используемых нами семи SSR-маркеров для идентификации генотипов томата белорусской и зарубежной селекции.

Материалы и методы

Исходным материалом для исследования служили 13 генотипов томата (*Solanum lycopersicum* L.) белорусской, российской и нидерландской селекции (табл. 3).

Применяемый нами метод SSR-анализа основан на использовании ПЦП с фланкирующими праймерами к короткому микросателлитному повтору. В результате ПЦП образуются продукты амплификации, отличающиеся

по длине на один или несколько нуклеотидов, что свидетельствует о наличии или отсутствии полиморфизма по данному локусу.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из листьев индивидуальных растений согласно методике, описанной Plaschke и др. [5] с модификациями. Растительную ткань массой 70 мг измельчали в ступке с жидким азотом до порошкообразного состояния. Полученную массу перено-

сили в 2 мл пробирки и ресуспендировали в 500 мкл буфера для выделения (100 mM Трис-НСl pH 8.5, 100 mM NaCl, 50 mM ЭДТА pH 8.0 и 2% SDS) и инкубировали на водяной бане 45 мин при 65°C. Депротеинизацию проводили хлороформом в отношении 1:1. Раствор ДНК отделяли при помощи центрифугирования при 3500 об/мин в течение 10 минут. Супернатант переносили в новые пробирки, после чего ДНК осаждали добавлением 800 мкл 96% ледяного этанола, промывали 70% этанолом, подсушивали и растворяли в 100 мкл воды.

ПЦР анализ. Анализ генотипов проводился с использованием SSR-маркеров описанным ранее методом [6]. Применяемый нами набор

микросателлитных маркеров подобран для томата в работах Smulders et al.[2], Areshchenkova and Ganal, 1999[7], Areshchenkova and Ganal 2002 [3], Грушецкая [и др.] [4].

Реакционная смесь для ПЦР, объемом 12,5 мкл, включала 50 нг ДНК, 250 нМ каждого праймера (Праймтех, Беларусь), 200 нМ dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 10 x PCR буфер «А» (Праймтех, Беларусь), 1 ед. Taq полимеразы (Праймтех, Беларусь). Реакцию проводили в амплификаторе iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) по программе: 5 мин 94°C, 35 циклов: 1 мин 94°C, 2 мин T отжига °C (таблица 1), 1 мин 72°C и затем 7 мин 72°C.

Таблица 1

Микросателлитные праймеры для идентификации полиморфизма культурных сортов томата

SSR-маркер	Прямой праймер	Обратный праймер	T отжига, °C
TMS 22	TGTTGGTTGGAGAACTCCC	AGGCATTTAAACCAATAGTAGC	55
LEMDDNa	ATCAAGGAACCTTTAGCTCC	TGCATTAAGGTTCAATAATGA	54
TMS 9	TTGGTAATTTATGTTTCGGGA	TTGAGCCAATTGATTATAAGTT	55
Ssr 63	CCACAACAATCCATCTCA	GCTTCCGCCATACTGATACG	55
Leef 1Aa	AAATAATGAGCTTGCCAATTG	CTGAAAGCAGCAACAGTATTT	55
Tms 37	ACAAACTCAAGATAAGTAAGAGC	GTGAATTGTGTTTAAACATGG	55
Est 253712	GAAATGAAGCTCTGACATCAA	TCATTGCTTGCATATGTTTCATG	55

Идентификация фрагментов амплификации. Образцы разделялись в полиакриламидном геле (7M мочевины, 6% акриламид / бис-акриламид (19 : 1), 1x TBE (0,09 M Трис-борат pH 8,3, 2 mM EDTA), 2% фотоинициатор (100 mM 1-гидрокси-циклгексил-фенил-кетон в этиленгликоле) на автоматическом лазерном флуоресцентном секвенаторе ALFexpress II (GE Healthcare, UK). Электрофорез проводили в 1x TBE буфере. 1 мкл продуктов каждой ПЦР реакции смешивали с 4 мкл буфера для нанесения (5 мг/мл голубой декстран в деионизованном формамиде), денатурировали 2 мин при 95°C и вносили в гель. Один из пары праймеров был маркирован флуоресцентной меткой для анализа на ALFexpress II секвенаторе. Каждая дорожка помимо образца содержала в качестве стандарта фрагменты ДНК известного размера, которые добавляли к

буферу для нанесения. Размер фрагментов вычисляли путем сравнения с данными стандартами при использовании программы Fragment Analyser 1.02 (GE Healthcare, UK).

Анализ уровня полиморфизма SSR-маркеров. Для оценки уровня полиморфизма использовали PIC*(polymorphic information content) – индекс полиморфного информационного содержания изучаемых SSR-маркеров. Коэффициент полиморфизма был рассчитан отдельно для каждого локуса микросателлитных последовательностей томата (табл. 2). Значение коэффициента вычисляли по формуле:

$$PIC = 1 - \sum(P_i)^2$$

где P_i – частота встречаемости i-ого аллеля [8].

Результаты и обсуждение

Нами были протестированы 13 генотипов томата белорусской и зарубежной селекции с применением 7 различных SSR-маркеров, обладающих высоким уровнем полиморфизма и расположенных на разных хромосомах томата (табл. 2).

Все использованные нами SSR-маркеры выявили полиморфизм в группе изучаемых сортов (табл. 3). В целом, для образцов коллекции об-

наружено 26 аллелей для семи SSR-маркеров. В результате анализа микросателлитных локусов было выявлено от 2 SSR-аллелей для TMS22 до 6 для Leef 1Aa (табл. 3). В среднем наблюдалось по 3,71 аллеля на маркер. По данным исследований авторов [4], при анализе 27 генотипов томата белорусской, российской и польской селекции с 15 SSR-маркерами, среднее количество аллелей на маркер составляло 2,7.

Таблица 2

Характеристика панели микросателлитных маркеров для анализа генотипов томата

Локус	Повторы	Хромосома	PIC*	Впервые описан
TMS 22	(GT) ₉ (AT) ₈ (AC) ₁₃ (GA) ₁₂	4	0.13	Areshchenkova и Ganal, 1999
LEMDDNa	(TA) ₉	5	0.65	Smulders et al., 1997
TMS 9	(GATA) ₂₆	12	0.46	Areshchenkova и Ganal, 1999
Ssr 63	(AT) _n	8	0.62	Frary et al., 2005
Leef 1Aa	(TA) ₈ (ATA) ₉	–	0.82	Smulders et al., 1997
Tms 37	(GA) ₂₁ (TA) ₂₀	5	0.53	Areshchenkova и Ganal, 1999
Est 253712	(AT) ₁₄	6	0.57	Areshchenkova и Ganal, 2002

PIC* – индекс полиморфного информационного содержания изучаемых SSR-маркеров;
– - отсутствие данных

В нашем исследовании значение индекса информативности (PIC) варьировало от 0.133 для маркера TMS 22 до 0.82 для маркера Leef 1Aa (табл. 2). Среднее значение PIC составило 0.54. В работе [4], данный

индекс был на уровне 0.37, что позволяет характеризовать выбранную нами группу SSR-маркеров, как высокополиморфную и использовать в дальнейшем для целей ДНК-паспортизации.

Таблица 3

Результаты анализа 13 генотипов томата с применением SSR-маркеров

Наименование образца	Размер продуктов амплификации в п.н. в результате применения SSR-маркеров						
	TMS 22	LEMDDNa	TMS 9	Ssr 63	Leef 1Aa	Tms 37	Est 253712
F ₁ Диво	159	229	349, 352	208	203	195	132, 147
F ₁ Арлекин	159	213	349, 352	208	203	191	147, 149
F ₁ Васильевна	159	213, 229	345, 349	208	203	191	132
F ₁ Маркиза	159	213	352	208	203, 211	191	147, 149
F ₁ Бобкет	159	215, 229	352	208, 249	217	195	147
F ₁ GS – 12	159+163	229	352	208	209	160, 222	147, 149
F ₁ Адапт	159	213, 215	345, 352	208	213	195	147

Продолжение таблицы

Гарант	159	229	352	249	213	195	147
F ₁ Омега	159	215, 229	352	206	211	195	147
F ₁ Шторм	159	215	352	208, 249	207, 217	195	145, 147
Пожар	159	215	352	216	209	195	147
Девиз	159	215	352	206	213	195	145
Ранний-310	159	215	352	249	213	195	147

Внутри группы используемых нами праймеров наблюдалось значительное варьирование выявляемого полиморфизма. Так, маркер с наибольшим значением PIC – Leef 1Aa (0.82) превзошел по данному показателю маркер TMS22 (0,133) в шесть раз. Однако, в работе [4] маркер TMS22 в результате анализа микросателлитных локусов оказался наиболее информативным среди 15 изучаемых маркеров. Это говорит о необходимости индивидуально подбора SSR-маркеров для каждой группы генотипов томата.

Как описано Smulders et al. (2007) [2] и S. Garcia-Martinez et al. (2006) [9], и в наших исследованиях маркер Leef 1Aa отмечен, как один из наиболее полиморфных SSR-маркеров, для которого число обнаруженных аллелей было максимальным и равнялось 6, а значение индекса информационного содержания достигало 0.82. Размер фрагментов амплификации колебался от 203 до 217 п.н.

Маркеры LEMDDNa, Ssr 63, Est 253712 и Tms 37 также выявили высокий уровень полиморфизма образцов коллекции генотипов томата. Значение PIC для них равнялось 0.65,

0.62, 0.57 и 0.53 соответственно, а количество обнаруженных аллелей – 3, 4, 4 и 4 (табл. 3).

Наименьшая полиморфная ценность в изучаемой коллекции генотипов томата была выявлена с применением маркеров TMS9 и TMS22. Для них число обнаруженных аллелей равнялось 3 и 2, соответственно, а значение индекса информационного содержания уменьшилось до 0.46 и 0.133.

Необходимо отметить, что практически для всех форм, кроме сортов Гарант, Пожар, Девиз и Ранний-310, количество аллелей у одного образца равнялось двум, что характерно для диплоидных видов и характеризует данную форму, как гетерозиготную по данному локусу.

Уровень выявляемого полиморфизма SSR-маркеров в разы выше у диких разновидностей томата в сравнении с культурными сортами [2]. Данный признак находится в прямой зависимости от генетического разнообразия образцов коллекции. Полученный нами высокий индекс информативности на уровне 0,54 характеризует данную коллекцию генотипов томата, как генетически полиморфную, а используемые SSR-маркеры, как высокоинформативные.

Заключение

Нами был проведен сравнительный анализ полиморфизма культурных сортов томата белорусской и зарубежной селекции с помощью 7 микросателлитных маркеров. Выделена группа SSR-маркеров, обладающих наивысшим индексом полиморфного информационного со-

держания, таких как Leef 1Aa, LEMDDNa, Ssr 63, Est 253712 и Tms 37. Для данных маркеров индекс PIC находится на уровне 0.82-0.53, что позволяет эффективно использовать их наряду с другими маркерами для идентификации сортов томата по микросателлитным локусам.

Список использованной литературы

1. Карлов, Г. И. Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические подходы для ускоренного создания селекционного материала растений с заданными свойствами: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.23; 03.00.15 /

Г. И. Карлов; Рос. госуд. аграрн. унив. МСХА им. К.А.Тимирязева.– М., 2009. – 50 с.

2. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions

of other *Lycopersicon* species / M.J.M. Smulders [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – V. 94. – P. 264–272.

3. Areshchenkova, T. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources / T. Areshchenkova, M.W. Ganal // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – V. 104. – T. 14. – P. 229–235.

4. Идентификация сортов и линий томата с помощью SSR-маркеров / З. Е. Грушецкая [и др.] // *Овощеводство.* – 2008. – с. 151–157.

5. Plaschke, J. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers / J. Plaschke, M.W. Ganal, M.S. Röder // *Theor. Appl. Genet.* – 1995. – Vol. 91. – P. 1001–1007.

6. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пше-

ницы, 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.

7. Areshchenkova, T. Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric regions / T. Areshchenkova, M.W. Ganal // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – V. 42. – P. 536–544.

8. Молекулярные методы паспортизации сортов груши / О.Ю. Урбанович [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика.* – 2008. – Том 8. – с. 160–167.

9. Garcia-Martinez, S. Evolution of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting utility for grouping closely related traditional cultivars / S. Garcia-Martinez et al. // *Genome.* – 2006. – Vol. 49. – P. 648–656.

Дата поступления статьи 15 сентября 2010 г.

А.М. Шишлова¹, Л.А. Сахно², Б.В. Моргун², Н.В. Кучук², Н.А. Картель¹

ВВЕДЕНИЕ κДНК *CYP11A1* ЦИТОХРОМА P450SCC ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РАСТЕНИЯ РАПСА

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, Д03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 148

Введение

Экспрессия в растениях гетерологичных генов, которые кодируют белки, выполняющие важные регуляторные функции в клетках животных, представляет интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения.

К числу таких белков относятся цитохромы P450, которые в клетках животных и растений катализируют монооксигеназные превращения самых разнообразных субстратов [1, 2]. Среди представителей этого суперсемейства гемопротеинов особое внимание привлекает цитохром P450_{scs}, локализованный в митохондриях и являющийся ключевым ферментом стероидогенеза в стероидогенных тканях животных, так как он осуществляет превращение холестерина в прегненолон – предшественник всех стероидных гормонов животных. Эту ключевую стадию стероидогенеза цитохром P450_{scs} катализирует с участием двух других компонентов электрон-транспортной цепи митохондрий – аденодоксина и аденодоксинредуктазы. Среди растений пока найдено лишь одно растение – наперстянка (*Digitalis sp.*), в митохондриях которого осуществляется аналогичный процесс. В этих растениях прегненолон является предшественником кардинолидов – стероидных гликозидов, обладающих кардиотонической активностью [3].

Вместе с тем показано, что существует сходство строения электрон-транспортной цепи митохондрий животных и растений. Например, биосинтез биотина в растениях происходит с участием белков-аналогов

аденодоксина и аденодоксинредуктазы животных [4].

Недавно в растениях обнаружены прогестерон и прогестерон-связывающие белки, которые являются гомологами прогестерон-связывающих белков животных [5]. При этом установлено, что прогестерон, связываясь с этими белками, вовлекается в процесс регуляции роста и развития растений.

В экспериментах, ранее проведенных в лаборатории молекулярной генетики по трансформации растений табака геном *CYP11A1*, кодирующим цитохром P450_{scs}, получены интересные результаты по влиянию данного гена на рост, развитие и физиолого-биохимические характеристики растений табака [6]. Так, трансгенные растения табака начинают цвести и образовывать семенные коробочки в среднем на две недели раньше, чем контрольные растения. Трансгенные растения превосходят контрольные по продуктивности, по содержанию растворимых и нерастворимых углеводов и белков.

Имеются также литературные данные по созданию трансгенных растений картофеля с геном *CYP11A1* цитохрома P450, устойчивых к гербициду [7].

В этой связи представляет большой интерес создание трансгенных растений с геном *CYP11A1* цитохрома P450_{scs} на культурах, имеющих хозяйственную ценность.

В данном сообщении представлены результаты по введению κДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{scs} из коры надпочечников быка в растения ярового рапса.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве исходного материала использовали семена ярового рапса (*Brassica napus* var. *L. oleifera* DC) сорта Магнат белорусской селекции, а также поддерживаемые в условиях *in vitro* растения ярового рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) промышленных сортов Мария селекции Национального аграрного университета УААН и сорта Магнат белорусской селекции.

Создание генетических конструкций. Полноразмерная кДНК *CYP11A1*, кодирующая незрелый цитохром P450_{scc} быка, выделенная

Г.В. Шпаковским [8], была нами клонирована в вектор pDH 51 под контролем конститутивного промотора 35SCaMV с образованием плазмиды pDH P450_{scc}. Из нее по сайтам рестрикции EcoRI была вырезана кассета, содержащая промотор 35S, ген цитохрома P450_{scc} и терминатор. Затем данная кассета была встроена в вектор pGreen 0229, содержащий ген *bar*, кодирующий фермент фосфинотрицинацетилтрансферазу. В результате был создан вектор pGBP450f, который использовался в экспериментах по трансформации растений (рис. 1).

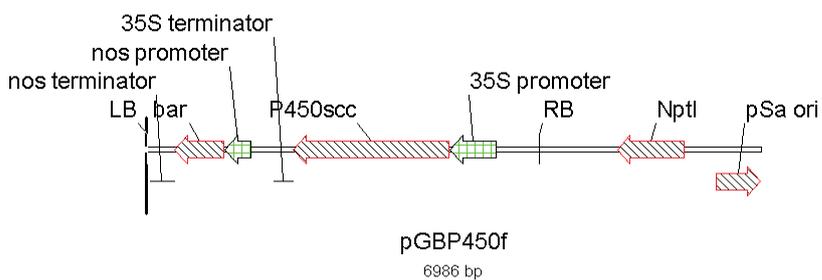


Рис. 1. Схема конструкции pGBP450f: RB, LB – правая и левая границы T-ДНК, P450_{scc} - ген *CYP11A1* цитохрома P450_{scc} под 35S промотором, *bar* – ген фосфинотрицинацетилтрансферазы под nos промотором.

Также нами был сконструирован вектор pVIP450nptII, в котором селективный ген *bar* был заменен на ген *nptII*, кодирующий фермент неомицинофосфотрансферазу. Данный фермент обуславливает рост трансформантов на канамицине. К сожалению, в экспериментах по трансформации растений, с данными векторами нам не удалось получить трансгенные растения.

Были поставлены новые эксперименты с

использованием конструкции pCB093 (рис. 2) и согласно модифицированной нами методике трансформации. Бинарный вектор pICH5290 служил реципиентом гена *CYP11A1* и основой для генетической конструкции pCB093. Для дизайна конструкции использовались компетентные клетки *Escherichia coli* штамма L-I Blue (Stratagene). Для переноса данной конструкции в растения использовался штамм агробактерии GV3101.

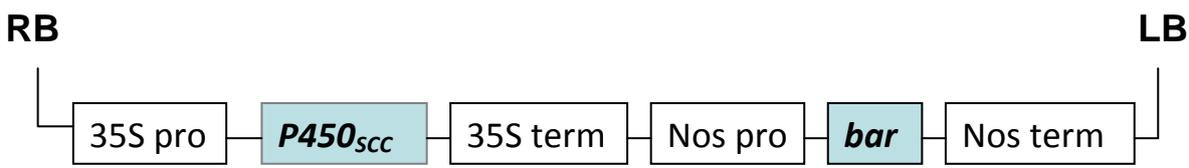


Рис. 2. Схема конструкции pCB093, использованной для трансформации: RB, LB – правая и левая границы T-ДНК, P450_{scc} - ген *CYP11A1* цитохрома P450_{scc} под 35S промотором, *bar* – ген фосфинотрицинацетилтрансферазы под nos промотором.

Щелочное выделение плазмидной ДНК, рестрикция, лигирование, электрофорез, выделение ДНК из геля, очистка ее, бактериальная трансформация, конъюгация с помощью трехродительского скрещивания осуществлялись общеизвестными методами [9].

Ночную культуру *Agrobacterium tumefaciens* pСВ093 (штамм GV3101) наращивали в 20 мл жидкой среды LB [10], дополненной 50 мг/л карбеницилина и 100 мг/л рифампицина, на качалке (180 об/мин) в течение 24 часов при 24°C в темноте. Затем агробактериальную суспензию разбавляли в 3 раза жидкой безгормональной средой MS и инкубировали в тех же условиях в течение 3-4 часов. Полученную суспензию использовали для инфицирования.

Agrobacterium tumefaciens-опосредованная трансформация рапса. В экспериментах по трансформации использовали листья 3-4-недельных растений, выращенных в асептических условиях (температура 24°C, освещенность 4000 – 5000 люкс при 16/8 (свет/темнота) фотопериоде. За 3-4 суток до инфицирования экспланты насаживали скальпелем и помещали для инициации каллуса на поверхность агаризованной среды MS, дополненной 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК, 0,1 мг/л БАП и 0,1 мг/л кинетина (среда I, табл.1). Кроме того, среда I содержала 1 г/л тиосульфата натрия в качестве агента, увеличивающего восприимчивость растительных тканей к агробактерии и таким образом повышающего эффективность трансформации [11]. В подготовленной агробактериальной

суспензии экспланты нарезали на сегменты размером приблизительно 0,3-0,5×0,3-0,5 см и выдерживали, периодически перемешивая, в течение получаса. Затем, подсушив фильтровальной бумагой, переносили их в те же чашки Петри, где проходило прекультивирование. Сокультивирование продолжалось в течение двух суток на свету в условиях термальной комнаты [12]. После этого экспланты отмывали от избытка агробактерий жидкой средой II, подсушивали и переносили на агаризованную среду II (табл.1) с тиосульфатом серебра (5 мг/л) и цефотаксимом (500 мг/л) для элиминации бактерий и роста каллуса. Через 5-7 суток культивирования в условиях термостата (24°C) их пассировали на среду того же состава, но с добавлением 5 мг/л фосфинотрицина (PPT) в качестве селективного агента. Формирование каллуса при этом продолжалось на рассеянном свету в течение последующих 7 – 10 дней. Для регенерации использовали среду MS с добавлением 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатина, 1 мг/л АБК, 1 мг/л НУК и 1 мг/л ГК (среда III, табл.1), 250 мг/л цефотаксима и 5 мг/л PPT. Спустя ещё 3 недели сформировавшиеся зеленые побеги пересаживали на безгормональную среду MS, дополненную 5 мг/л PPT, а остальные каллусы пассировали снова на регенерационную среду того же состава. Полученные растения выращивали на безгормональной агаризованной среде MS с 10 мг/л PPT. Формирование корней проходило в этих условиях без дополнительной инициации (рис. 3).



Рис. 3. Регенеранты рапса на морфогенной среде.

Таблица 1

Состав сред, использованных в экспериментах по трансформации рапса

Компоненты, мг/л	Среда*		
	I	II	III
сахароза	30 000	30 000	10 000
инозитол	300	300	100
гидролизат казеина	300	300	-
2,4-Д	2	2	-
НУК	1	1	1
кинетин	0,1	0,1	-
БАП	0,1	0,1	2
АБК	-	-	1
зеатин	-	-	1
ГК	-	-	1
тиосульфат Na	1000	-	-

*Основой являлась среда MS.

Молекулярно-генетический анализ. Тотальную ДНК предположительно трансгенных растений выделяли из листовой ткани с помощью набора реагентов K0512 (Fermentas) по методике изготовителя. Интеграцию чужеродных генов в растительный геном определяли с помощью ПЦР. Объем смеси для амплификации одного образца составлял 25 мкл, в него входили следующие реагенты: 100-200 нг ДНК, 2,5 мкл 10X буфера с NH_4SO_4 фирмы "Fermentas", 2,5 мкл 10мМ смеси нуклеотидов (dNTP) "Fermentas", 2 мкл 25 мМ MgCl_2 "Fermentas", 2,5 мкл каждого из праймеров, 0,2 мкл 0,5 ед. Taq ДНК-полимеразы "Fermentas", 10,7 мкл H_2O . Для идентификации присутствия целево-

го гена *CYP11A1* цитохрома P450_{ssc} использовали праймеры 5'-gccacatcgagaactccagaag-3' и 5'-ctgggtggaacatctttagacg-3', амплифицирующее фрагмент величиной 502 пн. Амплификацию проводили в амплификаторе «BioRad» с использованием следующих профилей: денатурация - 94°C 4 мин; отжиг праймеров - 94°C 30 сек; 58°C 30 сек; 72°C 45 сек, 30 циклов; ренатурация - 72°C 5 мин; 4°C ∞ мин. Продукт реакции разделяли в 1% агарозном геле с бромистым этидием в электрическом поле с помощью камеры для горизонтального электрофореза фирмы «BioRad». Фрагмент после электрофореза визуализировали с помощью системы BioRad GelDoc2000 (рис. 7).

Результаты и обсуждение

Из литературы известно, что цитохром P450_{ssc} синтезируется в цитоплазме клеток животных в виде белка-предшественника, который имеет молекулярную массу 54,5 кДа и содержит на N-конце своей полипептидной цепи экстрапептид из 39 аминокислотных остатков. Экстрапептид обуславливает транспорт цитохрома в митохондрии, где он подвергается протеолитическому процессингу, приобретая размер зрелой формы (49 кДа) и функциональную активность [6].

Было показано также, что синтезированный

in vitro P450_{ssc} с собственным экстрапептидом может импортироваться в изолированные растительные клетки [13].

Использованные нами векторы содержат кДНК гена *CYP11A1* длиной 2754 п.н., кодирующую белок-предшественник цитохром P450_{ssc} из коры надпочечников быка с лидерным N-концевым экстрапептидом. Наряду с геном *CYP11A1* в векторы pGBP450f и pCB093 введен также ген *bar* под *nos* промотором. Ген кодирует фермент фосфинотрицинацетилтрансферазу (PAT), который ацетирует сво-

бодную NH₂-группу фосфинотрицина (PPT), и таким образом, предотвращает токсичность гербицидов «Баста» и «Биалфос» для растений. Успешный рост растений на среде с фосфинотрицином означает, что ген *bar* находится в геноме растений и синтезирует фермент, разрушающий токсин фосфинотрицин [14].

В опыте по агробактериальной трансформации рапса сорта Магнат конструкцией pBI-P450nptIIIF, содержащей кассету 35S-P450+ген *nptII*, не удалось получить трансформанты (табл. 2). В качестве эксплантов в данном опыте использовались 5-7-дневные семядольные листочки - котиленоны (рис. 5).



Рис. 5. Экспланты рапса – семядоли.

В ходе данного опыта были получены зеленые, альбиносы, а также мозаичные растения. Отбор и укоренение данных регенерантов велся на средах, содержащих селективный агент

канамицин в концентрации 35 мг/л. Для инициации процессов ризогенеза у регенерантов в среду для укоренения добавлялась индолилмасляная кислота в концентрации 3 мг/л.

Таблица 2

Опыт по трансформации рапса конструкцией pBIP450nptIIIF

Опыт, контроль	Кол-во чашек, шт.	Кол-во эксплантов, шт.	Кол-во каллусов, шт.	Кол-во регенерантов (кол-во событий/кол-во реген./укор. реген.), шт./шт./шт.	Частота регенерации, %
контроль	№1	14	14	7/7/7	50%
	№2	11	11	5/5/5	45,45%
	№3	12	12	8/8/8	66,66%
опыт	№1	8	8	3/2(аль.)/0	-
	№2	10	10	6/3(аль.)+6/0	-
	№3	10	10	8/5(ал.)+4/0	-
	№4	8	8	7/4(ал.)/0	-
	№5	11	11	5/4(ал.)+2/0	-
	№6	10	10	7/6(ал.)+2/0	-
	№7	11	11	7/7(аль.)/0	-
	№8	10	10	8/8(аль.)/0	-
	№9	6	6	3/3(аль.)/0	-
	№10	8	8	2/2(моз.)	-
	№11	9	9	6/2(аль.)+2(моз.)/0	-
	№12	8	8	4/4(аль.)/0	-
№13	8	8	3/4(аль.)/0	-	

При дальнейшем культивировании на средах с канамицином в концентрации 35мг/л зеленые и мозаичные растения становились альбино-

сами, что свидетельствует об отсутствии или недостаточной экспрессии гена неомифотрансферазы (*nrpII*) (рис. 6).



Рис. 6. Регенерант-альбинос (опыт) и зеленое растений (контроль).

В результате экспериментов по агробактериальной трансформации сортов Магнат и Мария конструкцией pCB093 были получены 31 линия расте-

ний рапса, которые росли в условиях селективного давления фосфинотрицина, из них 23 линии на сорте Мария, 8 линий – на сорте Магнат (табл. 3).

Таблица 3

Молекулярно-биологический анализ регенерированных линий рапса, полученных в результате *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации с использованием вектора pCB093

Сорт	Линия	Характеристика линий				
		Устойчивость к PPT	ПЦР			
			<i>virD1</i>	<i>bar</i>	<i>cyp11A1</i>	
Мария	Bn12/93/1	+	-	+	+	
	Bn12/93/2	+	-	+	+	
	Bn12/93/7	-	-	-	-	
	Bn12/93/8	-	-	-	-	
	Bn12/93/10	+	-	+	+	
	Bn12/93/11	+	-	+	+	
	Bn12/93/12	+	-	+	+	
	Bn12/93/14	+	-	+	+	
	Bn12/93/15	+	-	+	+	
	Магнат	Bn9/93/2	+	-	+	+
		Bn9/93/3	+	-	+	+
		Bn9/93/6	+	-	+	+
		Bn9/93/9	+	-	+	+
		Bn9/93/13	+	-	+	+
		Bn9/93/14	+	-	+	+
Bn9/93/19		+	-	+	+	
Bn9/93/21	+	-	+	+		

Доказательства встройки генов *bar* и *CYP11A1* детектировали ПЦР анализом. Отсутствие агробактериальных генов *Vir*-района в геноме трансформантов определяли методом ПЦР со специфическими праймерами к бак-

териальному гену *virD1* (табл. 3).

На рисунке 7 представлена электрофореграмма ПЦР анализа тотальной ДНК трансгенных растений рапса сортов Мария и Магнат.

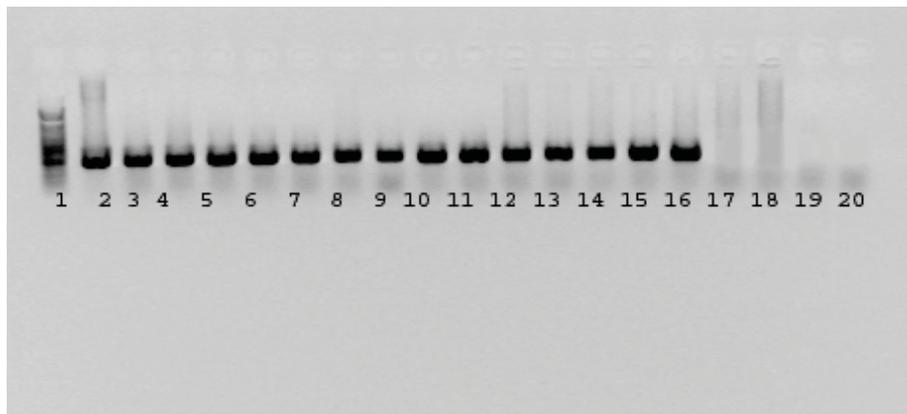


Рис. 7. ПЦР анализ трансгенных линий рапса с праймерами, комплементарными гену *CYP11A1* цитохрома P450_{scc}: 1 – маркер молекулярной массы 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas), 2 – положительный контроль ДНК плазмиды pCB093, 3-10 – трансгенные линии сорта Магнат, 11-16 – трансгенные линии сорта Мария, 17-18 – ДНК контрольных растений, 19 – смесь реагентов ПЦР без ДНК, 20 – H₂O.

Интеграция гена *CYP11A1* показана во всех линиях сорта Магнат и произвольно выбранных линиях сорта Мария. При амплификации с использованием праймеров 5'-gccacatcgagaacttcagaag-3' и 5'-ctggtgtggaacatctgtagacg-3' к гену *CYP11A1* и последующим разделением в агарозном геле был получен фрагмент, соот-

ветствующий позитивному контролю (плазмиде pCB093) и теоретически ожидаемому размеру 520 пн. В негативном контроле (ДНК нетрансгенных растений) фрагмент отсутствовал. Следовательно, представленные данные свидетельствуют о присутствии гена *CYP11A1* в геноме трансформантов T₀ поколения.

Заключение

Методом агробактериальной трансформации было получено 23 линии сорта Мария и 8 линий сорта Магнат. Доказано наличие встройки генов *bar* и *CYP11A1* методом полимеразной цепной реакции, а также отсутствие бактериальных ге-

нов *Vir*-района, на примере гена *virD1* в геноме трансформантов. В ходе дальнейшей работы нами предполагаются молекулярно-генетические, морфометрические исследования семенного материала растений T₀ поколения.

Список используемых источников

1. Adesnik M., Atchinson M. Genes of cytochrome P450 and their regulation // Critical Review Biochemistry. – 1986. – V. 19. – P. 247–305.
2. Yamanaka S., Suzuki E., Tanaka M. et al. Assessment of cytochrome P450 offers a useful tool for determining genetic diversity in higher

plant species// Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – V. 108, № 1-9. – P. 1–9.

3. Lindemann P., Lucner M. // Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata* // Phytochemistry. – 1997. – V. 46. – P. 507–513.

4. Piccioni A., Dance R. and Alban C. The plant biotin synthase reaction. Identification and characterization of essential mitochondrial accessory protein compartments // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278, № 27. – P. 24906–24975.
5. Lino M., Nomura T., Tamaki Y. et al. Progesterone: its occurrence in plants and involvement in plant growth // *Phytochemistry*. 2007. – V. 68. – P. 1664–1673.
6. Спивак С.Г., Бердичивец И.Н., Ярмолинский Д.Г. Манешина Т.В., Шпаковский Г.В., Картель Н.А. Создание и характеристика трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), экспрессирующих к-ДНК CYP11A1 цитохрома P450_{scc} // *Генетика*, 2009, – Т. 45, № 9, с.1217–1224.
7. Inui H., Kodama T., Okhava Y. et al. Herbicide metabolism and cross-tolerance in transgenic potato plants coexpressing human CYP1A1, CYP2B6 and CYP2C19 // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2000. – V. 66. – P. 116–129.
8. Шпаковский Г.В., Спивак С.Г., Мазаник С.Н., Ахрем А.А. Изучение структуры генов цитохрома P450XIA1 их экспрессии в гетерологичных системах // *Материалы II Всесоюзной планово-отчетной конференции по направлению «Генная и клеточная инженерия»* (ноябрь-декабрь 1991 г.), Пушино-на-Оке, 1992. – с. 58.
9. Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1989. – 1500 p.
10. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. – М.: Мир. – 1984. – 521 с.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. – 1962. – 15. – P. 473–497.
12. Zambre M., Terryn N., De Clercq J., De Buck S., Dillen W., van Montagu M., Van Der Straeten D., Angenon G. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells // *Planta*. – 2003 – 216. – P. 580–586.
13. Лузиков В.Н., Новикова Л.А., Спиридонова В.А. и др. Конструирование гетерологических митохондрий: импорт предшественника цитохрома P450_{scc} быка в растительные митохондрии // *Биохимия* 1994, – Т. 59, Вып. 7. – с.1098–1101.
14. Заяц А.И., Стехин И.Н., Путилина Н.В., Левченко Б.А. Клонирование гена устойчивости к гербициду биалафосу // *Биополимеры и клетка*. 1994. – Т. 10. № 3–4. – С. 84–88.

Дата поступления статьи 21 июля 2010 г.

О.Ю. Урбанович¹, З.А. Козловская², Н.А. Картель¹

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ В КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ И ВИДОВ ЯБЛОНИ, ВЫРАЩИВАЕМЫХ В БЕЛАРУСИ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072 г. Минск, Академическая, 27

²РУП «Институт плодоводства»
Республика Беларусь, 223013, Минская обл., Минский р-н, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

Введение

Мучнистая роса является одним из основных заболеваний яблони в мире. На территории Беларуси оно также достаточно широко распространено. Мучнистая роса яблони включена в перечень особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков Республики Беларусь. Вызывает это заболевание грибной патоген *Podosphaera leucotricha* Salm. Он зимует в виде грибницы в почках пораженных побегов, а весной споры гриба разносятся на молодые распускающиеся листья ветром, дождем и насекомыми. При благоприятных условиях споры прорастают, что приводит к заражению растений. Заражению мучнистой росой подвержены как плодоносящие, так и молодые деревья. Особенно сильно поражаются саженцы и сеянцы в питомниках. В большей степени подвержены заражению соцветия, листья, концы молодых побегов. Листья заболевших деревьев плохо развиваются, скручиваются, буреют и опадают. Побеги замедляют рост, искривляются и могут постепенно отмирать. Соцветия и цветки деформируются, что приводит к снижению урожая плодов. В случае, если инфекция развивается на плодах, на них появляется характерная ржавая сетка. Товарные качества таких плодов резко снижаются.

Большинство современных сортов яблони являются в той или иной мере восприимчивы к мучнистой росе, что приводит к необходимости использовать фунгициды, обра-

ботка которыми может достигать до 15 раз за вегетационный период в зависимости от региона возделывания и погодных условий [1]. Фунгициды достаточно эффективны и обеспечивают необходимую защиту деревьев в садах и питомниках. К сожалению, эти меры приводят к загрязнению окружающей среды. Кроме того, применение химических средств защиты требует значительных затрат трудовых и материальных ресурсов. В связи с этим актуальной задачей современной селекции яблони является создание сортов, обладающих естественной устойчивостью к *Podosphaera leucotricha*. Многолетние наблюдения в садах и питомниках показывают, что некоторые сорта и виды яблони практически не поражаются мучнистой росой даже в годы сильного развития патогена. Генетические основы их устойчивости не всегда точно известны. Отмечена как полигенная, так и моногенная устойчивость к мучнистой росе. Источники полигенной устойчивости встречаются как среди старых, так и среди современных сортов [2]. Выявить эти генотипы можно только в результате наблюдений за ростом деревьев в саду или питомнике в течение нескольких лет. Вместе с тем известны отдельные главные гены устойчивости, которые можно идентифицировать на молекулярном уровне [3].

В селекционных программах широко используются доминантные гены устойчивости к мучнистой росе *Pl1* из *Malus robusta* и *Pl2* из

Malus zumi, а также другие гены [4, 5]. Первый молекулярный маркер для генов устойчивости к этой болезни был разработан для гена *Pl1* [1]. Затем были созданы маркеры для идентификации генов *Pl2*, *Plmis*, *Pl-d*, *Pl-w* [6-9]. Наличие молекулярных маркеров к генам устойчивости к мучнистой росе обеспечивает возможность выявить источники этих генов и затем целенаправленно вводить нужные гены во вновь

создаваемые сорта яблони с помощью маркер-сопутствующей селекции.

Представленное исследование было проведено с целью выявления источников генов устойчивости к мучнистой росе в коллекции сортов и видов яблони, произрастающих на территории Беларуси. Исследование проводили с помощью молекулярных маркеров, сцепленных с данными генами.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектом изучения служили 130 сортов и видов яблони из сада РУП «Институт плодородства». В анализ были включены старые и современные сорта различного происхождения: Алесья, Алкмене, Амулет, Антей, Антоновка обыкновенная, Аламата, Ауксис, Афродита, Бабушкино, Банановое, Белорусский синап, Белорусское летнее, Белорусское малиновое, Белорусское сладкое, Белый налив, Болотовское, Боровинка, Ваяк, Веньяминовское, Вербное, Весялина, Ветеран, Витос, Дарунак, Джонаголд де Коста, Дискавери, Долго, Едера, Елена, Женева, Заря Алатау, Заславское, Имант, Имрус, Кандиль орловский, Кент, Коваленковское, Коробовка крупноплодная, Коштеля, Креб ГК-1, Лавфам, Лошицкое, Лучезарное, Макинтош, Медуница, Мелба, Мечта, Минкар, Минское, Надзейны, Народное, Несравненное, Новинка осени, Новое сладкое, Нора, Орловим, Орловское полесье, Осеннее полосатое, Отава, Память Вавилова, Память Исаева, Память Коваленко, Память Пашкевича, Память Сикоры, Память Сябаровой, Папировка, Пепин литовский, Пепин литовский улучшенный, Пепинка золотистая, Первинка, Перлына Киева, Пинова, Поспех, Реанда, Ребристое, Ревена, Река, Релинда, Ретина, Сава, Свежесть, Серуэл, Синап орловский, Скала, Слава победителям, Солнышко, СООР-10, Старт, Стойкое, Строевское, Сябрына, Теллисааре, Топаз, Утро, Уэлси, Фиеста, Флорина, Фридом, Цыганочка, Чаравница, Черное дерево, Чистотел, Чуланов-

ка, Щедрое, Эльстар, Эмрайр, Юбиляр, Юпитер, *M. × purpurea*, *M. coronaria* F., *M. floribunda* K2362, *M. ioensis*, *M. ioensis* 2352, *M. prunifolia*, *M. sargentii* × Ренет Симиренко, *M. siboldii* 9/22, *M. siboldii* × Спарган 25/170, *M. sieboldii* F., *M. silvestris*, *M. sonfardii* × 2414, *M. transitoria*, *M. × hybrid* MA1255, *M. zumi* orobs, *M. × cerasifera*, *M. sargentii*, *M. × robusta*, *M. baccata*.

Выделение ДНК. Из фрагмента листа отдельного растения были выделены препараты ДНК с помощью Genomic DNA Purification Kit фирмы Fermentas. Выделение проводили согласно рекомендованному протоколу.

Условия амплификации. Для идентификации генов *Pl1*, *Pl2*, *Pl-d*, *Pl-w* применяли сцепленные маркеры AT20-450, OPU02 SCAR, EM DM01, EM M02, выявляемые в результате ПЦР [1-4]. Название, последовательность и температура отжига праймеров представлена в таблице 1.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 40 нг ДНК, 75 мМ трис-НСl (рН 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 проводили в следующем режиме: 94°C – 4 мин; 40 циклов 94°C – 30 сек, T^{отж} – 1 мин, 72°C – 2 мин; 72°C – 8 мин.

Продукты амплификации 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).

Результаты и обсуждение

Одним из генов, определяющих устойчивость яблони к мучнистой росе, является ген *Pl1*, впервые идентифицированный в геноме

Malus robusta [4]. Ген устойчивости к мучнистой росе *Pl1* находится на 12 хромосоме [5]. Для его идентификации был разработан

молекулярный маркер AT20-450 [1]. SCAR-маркер AT20-450 является кодоминантным. Он получен на основе RAPD-маркера OPAT20₄₅₀ обнаруженного на расстоянии 4,5 сМ от гена

Pl1. В результате амплификации с маркером AT20-450 выявляются фрагменты длиной 450 и 500 п.н. Сцепленный с геном фрагмент имеет длину 450 п.н.

Таблица 1

Название, последовательность и температура отжига праймеров, использованных для идентификации генов устойчивости к мучнистой росе яблони

№	Ген	Название маркера	Последовательность нуклеотидов	T _{отж} ⁰	Литература
1	<i>Pl1</i>	AT20-450	F ATC AGC CCC ACA TGA ATC TCA TACC R ACA TCA GCC CTC AAA GAT GAG AAGT	62°C	[1]
2	<i>Pl-w</i>	EM M02	F CTG CAG ACT GTT TGT AAG TTG G R AAC TCC TTG ATT TCT CCT ATT GTT	56°C	[9]
3	<i>Pl-d</i>	EM DM01	F AGG ATA ATA ATC TAT CTT GTA AAG G R CCA TTC AGC CCA ACG AGT	53°C	[6]
4	<i>Pl2</i>	OPN18SCAR	F AGG TCA CTA AGC ATA TTT TTC CAA G R CTT GCC GCA ATA AGC CCC AAT TGG T	62°C	[8]
5	<i>Pl2</i>	OPU02SCAR	F CCG ACC GAT CAG GAA TTG TCA CCA G R TCG ATT ATC ACT ATG TAC GGG AGC A	62°C	[8]
6	<i>Pl2</i>	dr70F dr339R	AAC GAA GAT CAA GAA ACA TGG TGC CGT CAA TGG AAC ACC	53°C	данная статья
7	<i>Pl2</i>	dr55F dr336R	CTT GAC GAT GTT TGG ACC GAA G CGT CAA TGG AAC ACC ACC AC	57°C	данная статья
8	<i>Pl2</i>	dr55F dr350R	CTT GAC GAT GTT TGG ACC GAA G CTT CAG ACC TTT GCC GTC AAT G	57°C	данная статья

С помощью маркера AT20-450 ген *Pl1* был обнаружен у трех сортов из 130 образцов, взятых для исследования. Результаты представ-

лены в таблице 2. Маркерный аллель присутствует у сортов Чулановка, Долго, Аламата.

Таблица 2

Сорта и виды яблони, в которых идентифицированы маркеры, сцепленные с генами устойчивости к мучнистой росе

Образцы, содержащие маркер AT20-450 (ген <i>Pl1</i>)	Образцы, содержащие маркер EM M02 (ген <i>Plw</i>)	Образцы, содержащие маркер OPU02 SCAR (ген <i>Pl2</i>)
Аламата, Долго, Чулановка, <i>M. × cerasifera</i> , <i>M. sargentii</i> , <i>M. × robusta</i> , <i>M. baccata</i>	<i>M. ioensis</i> , <i>M. sieboldii</i> 25/177, <i>M. sieboldii</i> × Спарган 25/170, <i>M. × cerasifera</i> , <i>M. baccata</i> , <i>M. sieboldii</i> 25/175, <i>M. zumi</i> , <i>M. sargentii</i> , <i>M. sargentii</i> × Ранет Симиренко, Red silver Нора.	<i>M. sargentii</i>

В геноме 123 проанализированных образцов, в том числе в сортах, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь, искомый ген не найден. В тоже время маркерный аллель идентифицирован в геноме следующих видов яблони, представленных в коллекционном саду РУП “Институт плододоводства”: *M. × cerasifera*, *M. sargentii*, *M. × robusta*, *M. baccata*. Эти виды, согласно фитопатологическим исследованиям, практически не поражаются мучнистой росой. Они могут рассматриваться как потенциальные источники устойчивости к данной болезни.

Ген *Pl2*, впервые обнаруженный у *M. zumi*, также является эффективным источником устойчивости к мучнистой росе. Его идентификацию проводили с помощью двух пар сцепленных маркеров OPU02 SCAR и OPN18 SCAR [8]. Маркер к гену был обнаружен у одного из образцов *M. sargentii*.

Ген *Pl2* расположен на хромосоме 11, что было показано на двух независимых популяциях [7, 10]. Маркеры OPU02 SCAR и OPN18 SCAR, использованные для идентификации гена *Pl2*, расположены на расстоянии 8.6 и 8.2 сМ от него соответственно [3, 8]. Большое расстояние между маркерами и геном *Pl2* увеличивает вероятность прохождения рекомбинации между ними, что может затруднить анализ потомства, полученного от скрещивания устойчивых генотипов яблони, являющихся источниками данного гена.

Анализ области генома яблони, содержащей ген *Pl2*, показал, что на более близком расстоянии от гена, составляющем 4.9 сМ, находится последовательность гомологов генов устойчивости, относящаяся к NBS-LRR классу. Данная последовательность идентифицирована из EST библиотеки яблони и зарегистрирована в GenBank под номером DR033888 [3]. На основе этой последовательности нами были выбраны удобные для амплификации праймеры и созданы молекулярные маркеры, расположенные на меньшем расстоянии от гена *Pl2*. В общей сложности было отобрано три комбинации праймеров (табл. 1). Для каждой пары праймеров обрабатывались оптимальные условия амплификации. Первая пара праймеров ограничивает последовательность DR033888 от 70 до 339 нуклеотида. Праймеры получили

название dr70F и dr339R. Длина полученного в результате амплификации фрагмента соответствовала теоретически ожидаемой, а именно - 269 п.н. Оптимальная температура отжига праймера, подобранная экспериментальным путем на основании теоретических расчетов, составляла 53°C. Две пары дополнительных праймеров ограничивали последовательность DR033888 от 55 до 336 п.н. и от 55 до 350 п.н. Они были названы dr55F, dr336R и dr55F, dr350R. Оптимальная температура отжига праймера для данных комбинаций составила 57°C. Выявляемый в результате ПЦР продукт имел длину 281 и 295 п.н. соответственно. Однако при амплификации комбинации праймеров dr55F и dr336R кроме ожидаемого фрагмента длиной 281 п.н. наблюдались также фрагменты длиной 500 - 1300 п.н. Таким образом, в геноме яблони представлено более одной последовательности, гомологичной последовательности праймеров из комбинации dr55F и dr336R, что делает неоптимальным использование данной комбинации. В результате амплификации с комбинацией праймеров dr55F и dr350R выявляются аллели у сортов, у которых ген отсутствует. Результаты проведенных экспериментов показали, что для идентификации гена *Pl2* подходит комбинация праймеров dr70F и dr339R.

В этом же регионе 11 хромосомы расположен ген *Pl-mis* (*Pl-m*) [8]. Он впервые был обнаружен у mildew-immune seedling, полученного в результате скрещивания домашней яблони с крэбом неизвестного происхождения [11]. Маркер OPU02SCAR, позволяющий идентифицировать ген *Pl2*, также продуцирует фрагмент амплификации у генотипов, содержащих ген *Pl-mis*. В случае присутствия гена *Pl-mis* маркерный фрагмент имеет размер 2000 п.н. Среди анализируемой в представленном исследовании коллекции сортов маркерный фрагмент к гену *Pl-mis* обнаружен не был.

Идентификация гена *Pl-w* осуществлялась с помощью сцепленного с ним SCAR маркера EM M02 [9]. Присутствие гена определяется наличием фрагмента амплификации длиной 250 п.н. Маркерный аллель был выявлен у видов и гибридов *M. ioensis*, *M. sieboldii* 25/177, *M. sieboldii* <http://www.interfax.by/news/belarus/81179> Спарган 25/170, *M.* <http://www.interfax.by/news/belarus/81179>

cerasifera, *M. baccata*, *M. sieboldii* 25/175, *M. zumi*, *M. sargentii*, *M. sargentii* × Ранет Смирненко, а также сортах Red silver и Нора (табл. 2). Как видно из полученных результатов, основными источниками гена *Pl-w* являются дикие виды яблони или гибриды, полученные с их участием.

Для идентификации гена *Pl-d* был использован сцепленный SCAR маркер EM DM01 [6]. Ожидаемый фрагмент амплификации с данным маркером составлял 90 п.н. Проведенные исследования показали, что маркерный фрагмент амплифицируется в геноме широкого спектра сортов, в том числе у сортов, у которых данный ген представлен быть не может, как показывают полевые наблюдения и анализ родословной. Полученные результаты говорят о том, что маркер EM DM01 не может показывать точных ре-

зультатов о содержании гена *Pl-d* в коллекционных или неизученных ранее образцах. Данный маркер может использоваться в случае, когда необходимо оценить передачу маркерного фрагмента от контрастных по данному признаку родителей к потомкам.

Кроме указанных генов устойчивости к мучнистой росе у яблони описаны гены *Pl-a* и *Pl-n*. Ген *Pl-a* был идентифицирован в подвое Aotea, полученном от *M. sieboldii* [12]. Он расположен в том же регионе 11 хромосомы, что и гены *Pl2* и *Pl-mis* [3]. Широкого распространения в культивируемых сортах яблони он пока не получил. Ген *Pl-n* был выявлен в популяции, полученной от скрещивания X3191 × Novosibirski Sweet o/p/91.117 A01-003. Предварительные результаты показывают, что он может быть аллелен гену *Pl-1* [13].

Заключение

В целом, полученные результаты демонстрируют, что гены устойчивости к мучнистой росе не получили к настоящему времени широкого распространения среди культивируемых сортов, в том числе белорусской и российской селекции. Одной из причин, ограничивающих распространение генов устойчивости к мучнистой росе является то, что эти гены обнаружены в основном у диких видов яблони. Включение диких видов яблони в скрещива-

ние приводит к ухудшению качества и размера плодов, и требует больших затрат времени для успешного создания новых сортов [2]. Несмотря на это, гены *Pl-1* и *Pl2* интрогрессированы в современные сорта [14, 15]. Реализуются программы по созданию сортов, содержащих гены *Pl-d* и *Pl-w* [16]. Перспективным является направление по созданию коммерческих сортов с привлечением главных генов полигенной устойчивости.

Список использованных источников

1. Identification of PCR-based markers linked to the powdery-mildew-resistance gene *PII* from *Malus robusta* in cultivated apple / T. Markussen [et al.] // Plant Breeding. – 1995. – Vol. 114. – P. 530–534.
2. A partial diallel study of powdery mildew resistance in six apple cultivars under three growing conditions with different disease pressures / V.G.M. Bus [et al.] // Euphytica. – 2005. – Vol. 148. – P. 235–242.
3. // Genome Mapping and Breeding in Plants. Fruits and Nuts. / ed. C. Kole. – Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007. – P. 370.
4. Sources of field immunity to mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple / R.L. Knight, F.H. Alston // Can. J. Genet. Cytol. . – 1968. – Vol. 10. – P. 294–298.
5. Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *PII* and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene / F. Dunemann [et al.] // Plant Breeding. – 2007. – Vol. 126. – P. 476–481.
6. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance genes *Pl-d* and *Pl-w* in apple / C.M. James, K.M. Evans // Acta Hort. – 2004. – Vol. 663. – P. 123–127.
7. Genetics of apple powdery mildew resistance from *Malus zumi* (P12) / N. Seglias, C. Gessler // IOBC/WPRS Bull. – 1997. – Vol. 20. – P. 195–208.
8. Candidate resistance genes from an EST database prove a rich source of markers for major

genes conferring resistance to important apple pests and diseases / S. Gardiner [et al.] // *Acta Hortic.* – 2003. – Vol. 622. – P. 141–151.

9. Identification of SCAR markers linked to *Pl-w* moldew resistance in apple / K.M. Evans, C.M. James // *Theor Appl Genet.* – 2003. – Vol. 106. – P. 1178–1183.

10. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / R. Liebhard [et al.] // *Mol. Breed.* – 2002. – Vol. 10. – P. 217–241.

11. Genetic immunity to apple mildew incited by *Podosphaera leucotricha* / D.F. Dayton // *Hort. Science.* – 1977. – Vol. 12. – P. 225–226.

12. The selection of Aotea apple rootstocks for resistance to woolly aphis and to root canker, a decline and replant disease caused by basidiomycete fungi / J.B. Taylor // *NZ J Agri*

Res. – 1981. – Vol. 24. – P. 373–377.

13. Marker assisted selection for *Pl-I* powdery mildew resistance in apple – old markers for a new resistance gene? / F. Dunemann [et al.] // *Acta Hortic.* – 2004. – Vol. 663. – P. 757–762.

14. Progress in transferring mildew (*Podosphaera leucotricha*) resistance from *Malus* species to cultivated apple / F.H. Alston // *Bulletin IOBC wprs.* – 1983. – Vol. 6, № 4. – P. 87–95.

15. Breeding commercial apple cultivars in New Zealand with resistances to pests and diseases / A.G. White, V.G. Bus // *Acta Hortic.* – 1999. – Vol. 484. – P. 157–161.

16. Resistance to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) of apple seedlings growing under glasshouse and nursery conditions / T. Visser, J.J. Verhaegh // *Proc. Eucarpia Fruit Section – Fruit Tree Breeding.* – 1980. – P. 111–120.

Дата поступления статьи 22 июля 2010 г.

Н.И. Дубовец¹, Е.А. Сычева¹, Л.А. Соловей¹, Т.И. Штык¹, Е.Б. Бондаревич¹,
Л.Ф. Кабашникова², Г.Е. Савченко²

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ТЕТРАПЛОИДНЫХ ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ АМФИДИПЛОИДОВ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

В последнее десятилетие в связи с интенсивным развитием биологических технологий наблюдается существенное расширение круга объектов, включаемых в понятие генетических ресурсов растений. Использование методов отдаленной гибридизации, генной и хромосомной инженерии для целенаправленного преобразования геномов вывело работу с генетическими коллекциями за рамки познания генетического разнообразия культурных растений и их дикорастущих сородичей. Особое место в системе генресурсов растений заняли коллекции специального генетического материала – серии изогенных, анеуплоидных, аллоплазматических, изоплазматических, хромосомно-замещенных, хромосомно-дополненных, транслоцированных линий, а также различные амфиплоидные геномные

комбинации [1]. Такого плана материал в большинстве случаев не может быть непосредственно включен в селекционный процесс, однако представляет значительный интерес в качестве экспериментальных модельных систем для генетических исследований.

В ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» в результате многолетних исследований по отдаленной гибридизации и хромосомной инженерии создана оригинальная генетическая коллекция линий тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов с различными вариантами рекомбинантного генома. В данном сообщении приводятся результаты работ по формированию генетической коллекции тетраформ и ее использованию в работах по изучению особенностей геномного взаимодействия в гибридном геноме.

Материалы и методы

Исходным материалом для создания коллекции послужили гибридные популяции яровых тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов ПРАТ12, ПРАТ16, ПРАТ69 и ПРАТ72, полученные в результате скрещивания гексаплоидных тритикале (AABBRR, $2n=6x=42$) с диплоидной аллоплазматической рожью

S. cereale L. ($2n=2x=14$) [2]. Каждая из четырех популяций представляет собой потомство гибрида F_2 , репродуцируемое в условиях свободного опыления.

Гибридный материал был маркирован с использованием молекулярно-цитогенетических маркеров (С-бэндов) [3].

Результаты и обсуждение

Несмотря на то, что каждая из созданных нами тетраплоидных форм тритикале пред-

ставляет собой потомство одного гибридного растения, все они характеризуются неодно-

родным хромосомным составом. Это связано с особенностями геномной структуры гибридов F_1 , которые наряду с диплоидным геномом ржи содержат гаплоидные наборы хромосом А- и В-геномов пшеницы. Взаимозамещения хромосом этих наборов в ходе стабилизации рекомбинантного генома при условии, что он будет сформирован исключительно парами гомологов, теоретически могут привести к возникновению в потомстве каждого гибрида $128 (2^7)$ вариантов кариотипа. Если же в отдельных гомеологичных группах пшеничного компонента кариотипа сохраняются гетерологичные пары хромосом, то количество вариантов кариотипа многократно возрастает. Между тем присутствие в пределах формы даже двух вариантов кариотипа делает ее непригодной для практического применения. Так, наличие линейного материала тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов является обязательным условием для проведения работ по направленному синтезу замещенных форм гексаплоидных тритикале. Кроме того многовариантность кариотипа тетраформ позволяет использовать их в исследованиях, направленных на изучение вклада индивидуальных хромосом пшеницы в регуляцию различных генетических процессов, что также предполагает наличие линейного материала. В связи с этим нами была проведена работа по созданию коллекции идентифицированных линий тетраплоидных тритикале, однородных по хромосомному составу в пределах линии и различающихся между собой по наборам хромосом субгеномов пшеницы.

С этой целью первоначально в F_8 каждой из 4-х популяций яровых тетраплоидных тритикале была проведена изоляция 50 произвольно взятых колосьев. Завязавшиеся в колосе зерновки выращивались под индивидуальным номером в условиях принудительного самоопыления. Предполагалось, что частично автофертильные растения при отсутствии перекрестного опыления дадут

потомство с однородным хромосомным составом. Определенные надежды при этом возлагались на то, что растения с гетерогенным составом гомеологичных групп, как менее жизнеспособные, будут подвержены элиминации в ходе смены поколений. Однако эти надежды не оправдались. Впоследствии оказалось, что растения с гетерологичными парами хромосом по фертильности колоса часто превосходят таковые с парами гомологов [4]. Вследствие этого в ходе кариотипирования растений после шести инцуктов удалось выделить лишь одну линию (16(10)) с однородным составом пшеничного компонента кариотипа: 1A2B3A4A5A6A7B. Скорее всего, исходное растение F_8 , давшее начало этой линии, имело стабильный кариотип. У остальных инбредных форм было выявлено от двух до восьми вариантов сочетаний хромосом А- и В-геномов пшеницы.

В связи с этим мы вынуждены были воспользоваться иным более трудоемким методическим приемом, который заключался в следующем. Из популяций тетраформ были произвольно взяты 200 зерновок, которые перед высадкой в поле подвергались проращиванию. Один корешок проростка использовался для изготовления цитологического препарата, предназначенного для идентификации хромосомного состава растения, а сам проросток высаживался под индивидуальным номером. По данным хромосомного анализа отбирались линии со стабильным кариотипом, а у растений с гетерологичными парами хромосом пшеницы в следующем поколении анализировалось расщепляющееся потомство, и опять проводились отборы интересующего нас линейного материала.

В итоге была сформирована коллекция из 25 линий тетраплоидных тритикале, хромосомный состав которых представлен в таблице 1. Поскольку все линии имеют полный набор хромосом ржи, таблица содержит описание только пшеничного компонента кариотипа.

Таблица 1

Хромосомный состав пшеничного компонента кариотипов линий тетраплоидных тритикале

Линия	Гомеологические группы						
	1	2	3	4	5	6	7
ПРАТ 12(21)	ВВ	A ^T A ^T	ВВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 16(10)	АА	ВВ	АА	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 69(2)	В ^T В ^T	A ^T A ^T	A ^T A ^T	АА	АА	АА	АА
ПРАТ 72(2) 1к.	A ^T A ^T	A ^T A ^T	АА	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 72(7)	В ^T В ^T	ВВ	ВВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 72(7/1)	АА	ВВ	АА	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 72(7/3)	АА	ВВ	ВВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 72(31)	В ^T В ^T	A ^T A ^T	ВВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 72(40)	В ^T В ^T	A ^T A ^T	ВВ	АА	ВВ	АА	ВВ
ПРАТ 196(3)	В ^T В ^T	АА	АА	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 236(1)	В ^T В ^T	A ^T A ^T	ВВ	АА	АА	АА	АА
ПРАТ 236(2)	В ^T В ^T	A ^T A ^T	A ^T A ^T	АА	АА	АА	АА
ПРАТ 237(2)	АА	АА	ВВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 245(1)	АА	АА	A ^T A ^T	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 289	В ^T В ^T	A ^T A ^T	АА	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 381	A ^T A ^T	ВВ	ВВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 72(6/1)	A ^T В	АА	ВВ	АА	АА	АА	АВ
ПРАТ 72(6/2)	A ^T В	A ^T A ^T	ВВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 72(7/4)	АА	ВВ	АВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 72(7/5)	В ^T В ^T	ВВ	АВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 196(1)	АА	АВ	АА	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 196(2)	АВ ^T	АА	АА	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 237(1)	АВ ^T	АА	ВВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 242(1)	В ^T В ^T	АВ	АВ	АА	АА	АА	ВВ
ПРАТ 242(2)	В ^T В ^T	АВ	АА	АА	АА	АА	ВВ

Примечание: надстрочный знак ^T обозначает транслоцированную хромосому.

Из 25 коллекционных линий тетраплоидных тритикале 16 характеризуются стабильным кариотипом, когда все гомеологические группы пшеничного компонента представлены парами гомологов А- и В-геномов. В кариотипах остальных 9 линий (названных так условно, поскольку данные формы расщепляются и требуют постоянного хромосомного анализа с целью отбора растений с нужным вариантом кариотипа) одна или две гомеологические группы пшеничного компонента содержат гетерологические пары хромосом. При этом наиболее несбалансированными по составу рекомбинантного генома являются линия ПРАТ

72(6/1), содержащая пары гомеологов в 1-ой и 7-ой группах, и линия ПРАТ 242(1) с парами гомеологов во 2-ой и 3-ей группах. Данные линии включены в коллекцию для исследования дозовых эффектов хромосом.

Как видно из данных таблицы различия в хромосомном составе между отобранными линиями обусловлены разными сочетаниями хромосом в 1, 2, 3, и 7-ой гомеологических группах пшеничного компонента, в то время как 4-ая и 6-ая группы содержат хромосомы только А-генома пшеницы. В 5-ой гомеологической группе хромосомы В-генома пшеницы обнаружены лишь у линии ПРАТ 72(40).

19 линий 4х-тритикале содержат рекомбинантные хромосомы, образовавшиеся в результате кроссоверных обменов между гомеологами А- и В-геномов пшеницы. Наличие транслоцированных хромосом отмечено в 1, 2 и 3-ей гомеологичных группах (рисунки 1, 2).

ологами А- и В-геномов пшеницы. Наличие транслоцированных хромосом отмечено в 1, 2 и 3-ей гомеологичных группах (рисунки 1, 2).



Рис. 1. Кариотип линии тетраплоидных тритикале ПРАТ 381 с парой транслоцированных хромосом 1AS.1AL-1BL (стрелками обозначены места локализации транслоцированных сегментов хромосом)

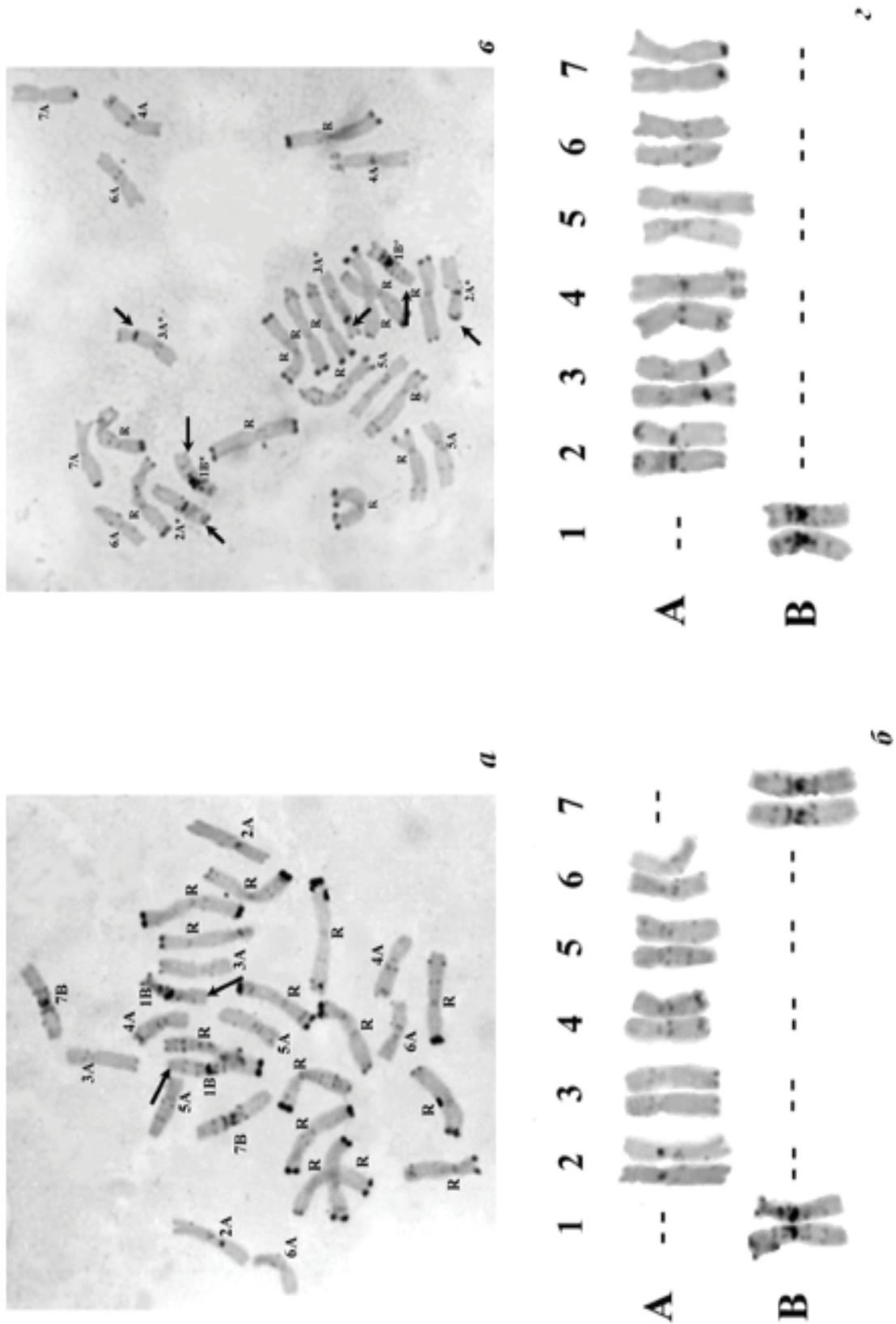
В первом случае перестройке подверглись дистальные участки длинных плеч хромосом 1A и 1B, в результате чего образовалась хромосома 1A с присутствием в длинном плече нетипичного для нее теломерного блока гетерохроматина и хромосома 1B без характерного для нее теломерного блока (рисунки 1, 2).

Во втором случае произошла транслокация фрагмента короткого плеча хромосомы 2B на дистальную часть короткого плеча хромосомы 2A (рисунок 2г) и наоборот.

И, наконец, в 3-ей гомеологичной группе перестройка произошла между длинными плечами хромосом, в результате чего крупный фрагмент плеча хромосомы 3B оказался транслоцированным на проксимальную часть плеча хромосомы 3A (рисунок 2г).

Как видно из данных таблицы 1, максимальное количество транслоцированных хромосом характерно для линий ПРАТ 69(2) и ПРАТ 236(2).

Созданный линейный материал был использован нами в серии генетических экспериментов. При этом из основной коллекции тетраплоидных тритикале по принципу подбора пар линий, различающихся между собой по составу лишь одной из семи гомеологичных групп пшеничного компонента кариотипа, была сформирована рабочая коллекция, включающая 12 линий. Например, линии ПРАТ 196(3) и ПРАТ 69(2) различаются по составу 7-й гомеологичной группы – у первой линии эта группа содержит пару хромосом В-генома, у второй – пару хромосом А-генома, в то время как остальные шесть гомеологичных групп имеют идентичный хромосомный состав (рисунок 2). Всего в отобранном материале имеется 16 пар сравнения: по четыре пары по 1 и 2-й гомеологичным группам, пять пар по 3-й группе, две пары по 7-й и одна пара по 5-й группе. Попарное сравнение включенных в рабочую



а, в – кариотипы линий ПРАТ 196(3) и ПРАТ 69(2) ; б, г – идиограммы дифференциально окрашенных хромосом пшеницы этих линий
 Стрелками обозначены места локализации транслоцированных сегментов на аберрантных хромосомах 1BS, 1BL-1AL, 2BS-2AS, 2AL, 3AS, 3AL-3BL

Рис. 2. Кариотипы линий ПРАТ 196(3) и ПРАТ69(2) – пара сравнения по 7-й гомеологичной группе.

коллекцию линий по степени проявления исследуемых параметров позволило оценить влияние индивидуальных хромосом А- и В-геномов пшеницы на экспрессию признаков продуктивности растения и их вклад в регуляцию мейотического спаривания [4, 5].

В дальнейшем было проведено изучение эффектов взаимозамещения хромосом А- и В-геномов на функционирование фотосинтетического аппарата тетраплоидных тритикале, в частности на биосинтез фотосинтетических пигментов и антоцианов.

Результаты измерения содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов), а также антоцианов в подфлаговом листе

выращенных в полевых условиях линий тетраплоидных тритикале представлены в таблице 2. Полученные данные свидетельствуют о высоком уровне изменчивости исследованных показателей в зависимости от хромосомного состава включенных в эксперимент линий. По содержанию хлорофиллов в расчете на единицу сухой биомассы листа выделялись линии ПРАТ 289, ПРАТ 72(40), ПРАТ 69(2) и ПРАТ 236(1), у которых значение показателя превысило 7 мг. У остальных линий содержание Хл (а+в) варьировало от 5,31 до 6,99 мг. Минимальное значение показателя отмечено для линии ПРАТ72 (31). Эта же линия характеризовалась самым низким содержанием каротиноидов.

Таблица 2

Содержание пигментов в подфлаговом листе тетраплоидных тритикале с различными вариантами кариотипа

Линия	Хромосомный состав пшеничного компонента кариотипа	Пигменты, мг/г сухой массы		
		Хл. (а+в)	Каротиноиды	Антоцианы
ПРАТ 72(2) ПРАТ 289	AA AA AA AA AA AA BB BB AA AA AA AA AA BB	6,24±0,38 8,53±0,85	1,48±0,09 1,95±0,22	0,0790±0,0054 0,0473±0,0050
ПРАТ 245(1) ПРАТ 289	AA AA AA AA AA AA BB BB AA AA AA AA AA BB	6,55±0,23 8,53±0,85	1,54±0,06 1,95±0,22	0,0773±0,0065 0,0473±0,0050
ПРАТ 245(1) ПРАТ 16(10)	AA AA AA AA AA AA BB AA BB AA AA AA AA BB	6,55±0,23 6,41±1,46	1,54±0,06 1,58±0,37	0,0773±0,0065 0,1152±0,0062
ПРАТ 245(1) ПРАТ 72(7/1)	AA AA AA AA AA AA BB AA BB AA AA AA AA BB	6,55±0,23 5,68±0,44	1,54±0,06 1,35±0,09	0,0773±0,0065 0,1094±0,0030
ПРАТ 237(2) ПРАТ 381	AA AA BB AA AA AA BB AA BB BB AA AA AA BB	5,81±0,95 6,30±1,09	1,35±0,22 1,48±0,27	0,0945±0,0038 0,1000±0,0079
ПРАТ 196(3) ПРАТ 72(31)	BB AA AA AA AA AA BB BB AA BB AA AA AA BB	6,99±0,38 5,31±0,63	1,64±0,09 1,24±0,16	0,1141±0,0067 0,1271±0,0090
ПРАТ 245(1) ПРАТ 237(2)	AA AA AA AA AA AA BB AA AA BB AA AA AA BB	6,55±0,23 5,81±0,95	1,54±0,06 1,35±0,22	0,0773±0,0065 0,0945±0,0038
ПРАТ 72(31) ПРАТ 72(40)	BB AA BB AA AA AA BB BB AA BB AA BB AA BB	5,31±0,63 7,75±0,43	1,24±0,16 1,78±0,10	0,1271±0,0090 0,1258±0,0086
ПРАТ 69(2) ПРАТ 289	BB AA AA AA AA AA AA BB AA AA AA AA AA BB	7,34±0,98 8,53±0,85	1,67±0,24 1,95±0,22	0,0422±0,0067 0,0473±0,0050
ПРАТ 236(1) ПРАТ 72(31)	BB AA BB AA AA AA AA BB AA BB AA AA AA BB	7,29±0,54 5,31±0,63	1,65±0,10 1,24±0,16	0,1302±0,0092 0,1271±0,0090

Примечание: жирным шрифтом выделены хромосомы, по которым проводилось сравнение

Как известно, каротиноиды в хлоропластах играют двойную роль. С одной стороны, они являются вспомогательными пигментами светособирающей антенны, улавливающими солнечный свет определенного спектрального состава, с другой – выполняют защитные функции: принимают на себя энергию от избыточного количества возбужденных молекул хлорофилла и безопасным для фотосинтетического аппарата способом рассеивают ее в виде тепловой энергии [6]. Таким образом, содержание каротиноидов является важным показателем стрессоустойчивости фотосинтетического аппарата. Интересно отметить, что в исследованном материале наиболее высокие значения этого показателя наблюдались у тех же самых линий, которые характеризовались высоким содержанием хлорофиллов и наоборот. Наличие положительной корреляции между содержанием хлорофиллов и каротиноидов указывает на сбалансированное формирование фотосинтетического аппарата 4х-тритикале.

При изучении устойчивости растений к действию стрессоров разной природы необходима информация не только о состоянии фотосинтетического аппарата, но и о содержании пигментов внепластидной природы – антоцианов. Как видно из данных таблицы 2, для большинства линий свойственна отрицательная корреляция между содержанием

фотосинтетических пигментов и антоцианов. Самым низким содержанием антоцианов характеризовались имевшие максимальное содержание хлорофиллов и каротиноидов линии ПРАТ 69(2) и ПРАТ 289, и наоборот самое высокое значение показателя отмечено у линии ПРАТ 72(31), отличавшейся минимальным содержанием фотосинтетических пигментов. Исключение из правила составили линии ПРАТ 72(40) и ПРАТ 236(1), у которых (особенно у первой из них) все исследованные показатели были на уровне лучших значений.

При попарном сравнении линий установлена зависимость содержания каротиноидов от хромосомного состава 1 и 5-й гомеологичных групп. Линии с наличием в этих группах хромосом В-генома пшеницы содержали на 25-30% больше пигментов, чем линии с хромосомами 1А и 5А. В то же время на содержание антоцианов напротив положительный эффект оказывало присутствие в 1-й гомеологичной группе гомологов А-генома. Линии с хромосомой 1А по содержанию антоцианов превосходили линии с хромосомой 1В на 40%.

Полученную информацию следует учитывать в работах по интрогрессивной гибридизации с целью прогнозирования положительных и негативных последствий удаления из кариотипа определенных хромосом пшеницы при замещении их на соответствующие гомеологи культурных и дикорастущих видов.

Заключение

Представленные выше результаты исследований наглядно демонстрируют возможность использования созданного линейного материала тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов в работах по генетическому анализу, в частности, для изучения влияния отдельных хромосом пшеницы на проявление адаптивных и хозяйственно-ценных признаков. Использованный при этом принцип попарного сравнения линий, различающихся по хромосомному составу лишь одной гомеологичной

группы, позволяет избежать ряда недостатков, свойственных анеуплоидному анализу, а именно: отрицательных последствий, обусловленных состоянием анеуплоидии, и компенсаторного эффекта, вызванного присутствием гомеологов из других субгеномов пшеницы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант №Б09СО-004).

Список использованных источников

1. Хотылева, Л.В. Генетические коллекции растений / Л.В. Хотылева [и др.] // Генетические основы селекции растений / под ред.

А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларус. наука, 2008 – Т.1: Общая генетика растений. – Гл.11. – С. 488–518.

2. Тетраплоидные тритикале (создание, цитогенетическое изучение и использование в селекции) / В.Е. Бормотов [и др.] – Минск: Наука и техника, – 1990. – 136 с.

3. Идентификация хромосом А и D геномов пшеницы с использованием замещений и перестроек между гомеологами у пшеницы и тритикале / Н.С. Бадаев [и др.] // Докл. Акад. Наук СССР. – 1983. – Т. 273, – № 4. – С. 994–996.

4. Сычева, Е.А. Тетраплоидные тритикале как объект для цитогенетических исследований. II. Изучение эффектов взаимозамещения хромосом пшеницы на экспрессию призна-

ков продуктивности / Е.А. Сычева, Н.И. Дубовец // Весці НАН Беларусі. Сер.біял.наук. – 2003. – № 3. – С. 57–59.

5. Сычева, Е.А. Тетраплоидные тритикале как объект для цитогенетических исследований. I. Изучение роли индивидуальных хромосом пшеницы в регуляции мейотического спаривания / Е.А.Сычева, Н.И.Дубовец // Весці НАН Беларусі. Сер.біял.наук. – 2003. – № 2. – С. 52–55.

6. Demmig-Adams, B. *In vivo* functions of carotenoids in higher plants / B. Demmig-Adams, B.A.M. Gilmore, W.W. Adams // FASEB J. – 1996. – Vol. 10, № 4 – P. 403–412.

Дата поступления статьи 16 июля 2010 г.

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ГЕНОМА У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МУТАЦИЙ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА СИНДРОМЫ ХРОМОСОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ

¹ ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

² ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»
Республика Беларусь, Орловская, 66, Минск, 220053

Введение

Среди генетически детерминированных заболеваний выделяются болезни и/или синдромы, для которых типична повышенная частота нарушений хромосомной структуры. Они объединены в группу синдромов хромосомной нестабильности (СХН), к которой относятся анемия Фанкони (АФ), атаксия телангиэктазия (АТ), синдром Ниймеген (СН) и многие другие заболевания [1].

Синдром Ниймеген (Nijmegen breakage syndrome), OMIM #251260 – редкое аутомно-рецессивное заболевание, характеризующееся триадой симптомов: микроцефалия с изменением лицевого скелета по типу «птичьего лица», прогрессирующий иммунодефицит, повышенная ломкость хромосом [2]. Заболевание вызывается мутацией в гене *NBS1*, который картирован на 8 хромосоме (8q21). Как правило, это – делеция в экзоне 6 (657del15) [3]. Ассоциированная с СН мутация распространена повсеместно, но наиболее часто встречается в славянских популяциях [4, 5]. Продукт гена *NBS1*, нибрин, взаимодействует с протеинами hMre11 и Rad50, образуя комплекс Mre11/Rad50/Nbs1 [3], участвующий в репарации двунитевых разрывов ДНК. Нарушение регуляции этого комплекса в результате отсутствия или снижения активности нибрина повышает чувствительность клеток пациентов с СН к ионизирующей радиации [6], приводит к накоплению мутаций и канцерогенезу (лимфомам и лейкозиям) [7, 8]. Установлено взаимодействие нибрина с продуктами других

генов, вовлеченных в репарацию ДНК, в том числе, с BRCA и АТМ-киназой [9].

Анемия Фанкони (Fanconi anemia), OMIM #227650 – заболевание кроветворной системы, наследуемое по аутомно-рецессивному типу; характеризуется врожденными пороками развития, нарушением гемопоэза, высоким риском развития миелоидной лейкемии и солидного рака [10]. Известна группа генов, мутации в которых приводят к АФ. Частота носителей мутаций *FANCA* колеблется в разных этнических группах от 1:300 до 1:90, что позволяет прогнозировать рождение детей с этой патологией 1 на 360000 и 1 на 30000 населения, соответственно [11]. Связь мутаций в генах *FANCA* с фенотипом до конца не ясна, однако установлено, что у больных с этим заболеванием нарушен ответ ДНК на индукцию двунитевых разрывов ДНК за счет дефекта гомологичной рекомбинации и специфического пути, контролируемого геном *FANCD1*, идентичным *BRCA2* [12, 13].

Пациенты с предполагаемым диагнозом СХН представляют группу риска по многим показателям:

- (а) уязвимости генома к действию ДНК-повреждающих факторов окружающей среды,
- (б) иммунодефициту и связанной с ним склонности к различным инфекционным и соматическим заболеваниям,
- (в) задержке физического развития,
- (г) нейродегенеративным изменениям,
- (д) онкопатологии.

Все это в комплексе приводит к существенному снижению качества и продолжительности жизни. Раннее выявление этих синдромов позволяет решить ряд важных задач, связанных с клиническим и витальным прогнозом для пациента, генетическим прогнозом для семьи, выбором способов возможной пренатальной диагностики, тактики лечения и профилактики. Естественно, что наиболее точная диагностика – обнаружение соответствующих мутаций, однако уже сейчас насчитывается около 150 генов репарации [14], среди которых десятки мутантных аллелей ассоциированы с СХН. Поэтому молекулярно-генетическая идентификация представляет собой этап окончательной верификации того или иного диагноза, но не снимает проблемы ранней диагностики СХН. Известно о существовании специфических цитогенетических маркеров для некоторых из этих синдромов. В частности, наряду с повышенной цитогенетической нестабильностью перестройки в хромосомах 7 и 14 служат основанием для постановки диагноза СН и АТ, а гиперчувствительность хромосом к агентам, вызывающим сшивки ДНК, указывает на АФ [2, 15].

Несмотря на редкие случаи выявления тех или иных СХН, обуславливающие их мутации встречаются достаточно часто в гетерозиготном состоянии (например, 1:177 для 657del5 в славянских популяциях и 1:90 для *FANC* в популяции ашкенази, [4, 16]). Поскольку ге-

терозиготное носительство таких мутаций повышает предрасположенность к канцерогенезу [17, 18], ранняя диагностика этого состояния имеет немаловажное практическое значение.

Настоящее исследование посвящено сравнительной оценке целостности генома у пациентов с диагнозом СХН и их родственников с помощью цитогенетического анализа и разрабатываемой технологии диагностики геномной нестабильности, основанной на применении метода ДНК-комет. Метод ДНК-комет имеет свои преимущества, в частности, позволяет использовать неделящиеся клетки и судить о репарационном процессе [19, 20], что очень важно в случае СХН, так как дефекты репарации ДНК являются определяющим этиологическим и патогенетическим фактором при этих заболеваниях. В лимфоцитах периферической крови, полученных от пациентов, анализировали цитогенетические показатели, а также уровни эндогенных повреждений ДНК, чувствительность ДНК к окислительному стрессу, индуцированному пероксидом водорода (100 мкМ, 1 мин, 4°C); кинетику и эффективность репарации ДНК при инкубации лимфоцитов в течение 3 ч после окислительного стресса. Данные, полученные у пациентов с помощью обоих подходов, сравнивали с характеристиками стабильного генома у здоровых лиц.

Материалы и методы

Исследуемая группа сформирована из числа пациентов ГУ РНПЦ «Мать и дитя» с клинически установленными диагнозами СН, АФ и другими СХН. В качестве контроля исследована группа здоровых доноров-волонтеров. Обследование проводилось в соответствии с международными требованиями о добровольном согласии и соблюдении конфиденциальности личной информации.

Объект исследования – лимфоциты периферической венозной крови.

Цитогенетическая диагностика включала стандартное кариотипирование с помощью GTG-метода дифференциального окрашивания метафазных хромосом согласно Международной системе номенклатуры хромосом человека (ISCN 2009) [21]. Кроме того, проводился анализ частоты и спектра аберраций хромо-

сом, которые также регистрировались в соответствии с принципами ISCN 2009 [21]. Для оценки частоты и спектра аберраций хромосом проводили анализ 100 метафаз. В случае клинически предполагаемого диагноза СН на GTG-окрашенных препаратах дополнительно определяли сайт-специфические перестройки хромосом с точками разрывов в сегментах 7p13, 7q35, 14q11 и 14q32 [22]. Для исследования маркерных перестроек просматривали 50 клеток. В случае подозрения на АФ выполняли стресс-тест, для чего митомицин С (ММС) в дозе 0.1 мкг/мл добавляли в культуру лимфоцитов на последние 24 часа культивирования. Затем готовили препараты и просчитывали по 100 метафаз. Кластогенный эффект ММС у больных сравнивали с действием этого агента у здоровых индивидуумов [23].

Метод ДНК-комет (щелочной гель-электрофорез единичных клеток) применяли для анализа частоты эндогенных и экзогенных повреждений ДНК, а также кинетики репарации ДНК после окислительного стресса в соответствии с разработанными протоколами. Для этого использованы лимфоциты сразу после их выделения из периферической венозной крови центрифугированием в градиенте Histopaque-1077 (ICN). Клеточную суспензию обрабатывали пероксидом водорода (H_2O_2 , 100 мкМ) при 4°C в течение 1 минуты, после чего клетки отмывали от мутагена охлажденным буферным раствором и затем инкубировали при 37°C в течение 3-х часов. Для оценки кинетики элиминации повреждений ДНК и эффективности репарации ДНК образцы отбирали на 0, 15, 30, 60, 120 и 180-й минуте после обработки лимфоцитов H_2O_2 . Повреждения ДНК определяли визуально по длине «хвоста кометы» при флуоресцентном микропиро-

вании препаратов, а уровень поврежденности ДНК рассчитывали по известной формуле и выражали в условных единицах (arbitrary units, a.u.) [24]. Эффективность репарации ДНК (процент элиминированных повреждений ДНК) вычисляли по разности между показателями уровня повреждений ДНК (a.u.) на 0-й минуте и в последующих точках анализа относительно 0-й точки.

Статистический анализ и графическое представление результатов выполнены с помощью программного обеспечения Microsoft Office (Excel-2000). При сравнении частотных показателей по точному критерию Фишера и проведении регрессионного анализа использовали пакет прикладных программ для статистической обработки данных АВ-STAT, разработанный в.н.с. Института генетики и цитологии Анощенко Б.Ю.; показатели, полученные с помощью метода ДНК-комет, сравнивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Стандартное кариотипирование показало нормальный кариотип у всех пациентов. Данные цитогенетического анализа состояния хромосомного аппарата у пациентов с клинически предполагаемым диагнозом СХН приведены в таблице 1. Кроме того, у пациентов с предполагаемым диагнозом СН учитывали сайт-специфические aberrации хромосом, а у пациентов с предполагаемым диагнозом АФ и их родственников определяли чувствительность хромосом к ММС в соответствии с разработанными «Инструкциями» по цитогенетической диагностике указанных заболеваний [22, 23].

Из таблицы 1 видно, что у пациентов с диагнозом СН индивидуальные частоты aberrантных метафаз, за исключением одного случая, существенно превышают этот показатель в контрольной группе здоровых лиц, а спектр aberrаций хромосом явно сдвинут в пользу aberrаций хромосомного типа. В среднем отношение количества aberrаций хромосомного/хроматидного типа у больных детей составляет 1:0.69 вместо 1:2.33 в норме. У этих же пациентов выявлены следующие маркерные aberrации хромосом: t(7;7)(p13;q35) у пациента 1/542; t(7;7)(p13;q35) у пациентов 2/512, 3/632, 4/635; t(7;14)(p15;q12) у пациентов 4/635 и 5/759, t(14;14)(q12;q32) у

пациента 3/632; del(14)(q12) у пациента 4/635 и del(7)(q35) у пациента 2/512; t(7;14)(q35;q11) и t(1;14)(p35;q11) у пациента 5/759. Обнаружение сайт-специфических перестроек в хромосомах 7 и 14 позволило подтвердить диагноз СН.

У пациента с предполагаемым диагнозом АФ (6/638) обнаружена очень высокая частота спонтанных aberrаций хромосом (56%), которая увеличилась в ответ на обработку лимфоцитов *in vitro* ММС до 245%, то есть более чем в 10 раз по сравнению с контролем. Гиперчувствительность хромосом к агентам, вызывающим сшивки ДНК, типичная для АФ, позволила подтвердить данный диагноз.

У пациента 7/665 наблюдался чрезвычайно высокий уровень спонтанных нарушений хромосомной структуры. Метафазы имели множественные aberrации хромосом, наблюдался широкий спектр повреждений, отмечалась фрагментация и «пульверизация» хромосом. Однако и клиническая, и цитогенетическая картины отличались от симптоматики известных заболеваний, принадлежащих к группе СХН.

Таким образом, клинические проявления и цитогенетическая диагностика позволили установить СН у 5-ти пациентов, АФ у одного пациента и диагноз «неуточненный СХН» у одного пациента.

В группе потенциальных гетерозиготных носителей мутации, ответственной за СН, средняя частота спонтанных aberrаций хромосом более чем в 2 раза превосходила контрольный уровень. У матери пробанда с АФ частота aberrантных клеток не выходила за пределы вариабельности, характерной для здоровых представителей белорусской популяции [25]. У одного из родителей пациента с недифференцированным СН частота aberrаций хромосом достоверно превышала контрольный уровень.

Диагностическая ценность цитогенетиче-

ских показателей для пациентов с СН не вызывает сомнений, но цитогенетический анализ может оказаться полезным и для выявления хромосомной нестабильности у их ближайших родственников как потенциальных гетерозиготных носителей соответствующих мутаций. Так, известно, что гетерозиготы *NBS1*, то есть родители и сибсы пациентов с СН, имеют повышенный уровень спонтанных aberrаций хромосом [26]. Полученные нами результаты также указывают на возможное наличие мутаций в гетерозиготном состоянии, по крайней мере, у родителей пациентов 3/632, 4/635 и 7/665.

Таблица 1

Частота и спектр aberrаций хромосом у пациентов с предполагаемым диагнозом СН и их родственников

Номер/код	Метафазы (n)	Частота, %		Типы перестроек, %	
		aberrантных клеток	aberrаций	хромосомный	хроматидный
Спонтанный уровень					
Контроль	2000	2,50±0,35	2,50±0,35	0,75±0,19	1,75±0,29
Пробанды СН					
1/542	100	7*	7*	3*	4
2/512	100	5	5	3*	2
3/632	100	21**	21**	15**	6**
4/635	100	22**	23**	12**	11**
5/759	100	15*	16*	8*	8*
Среднее ± стандартная ошибка		13,75±1,72*	14,0±1,73*	8,25±1,38*	5,75±1,16*
Родители пациентов с СН					
1.1/643 (мать)	100	6*	6*	0	6
3.1/633 (мать)	100	5	5	2	3
3.2/634 (отец)	100	8**	8**	1	7**
4.1/636 (мать)	100	8**	8**	4	4
4.2/637 (отец)	100	5	5	0	5
5.1/759 (мать)	100	4	4	2	2
5.2/759 (отец)	100	3	3	1	2
Среднее± стандартная ошибка		5,57±0,72*	5,57±0,72*	1,43±0,53	4,14±0,74*
Пробанд АФ					
6/638	100	38**	56**	8	48**
Родители пациента с АФ					
6.1/639 (мать)	100	6*	6*	1	5
Пациент с клинически недифференцированным СН					
7/665	35	63**	323**	94**	229**
Родители пациента с недифференцированным СН					
7.1/665 (мать)	100	5	6*	2	4

Продолжение таблицы

7.2/665 (отец)	100	9*	15**	0	15**
Индукцированный уровень					
Контроль	550	17,45±1,62	21,64±1,76	3,64±0,8	18,0±1,64
5/638 (пробанд)	20	100**	245**	25	220*
5.1/639 (мать)	100	10	10	1	9
7/665 (пробанд)	Множественные АХ				

Примечание: первая цифра в номере указывает на пациента, вторая цифра – через точку (.1, .2) – на родителей пациента; трехзначный код соответствует записи в журнале регистрации цитогенетических исследований. Статистически значимые различия между индивидуальными частотами aberrаций хромосом определены согласно точному тесту Фишера (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$); статистическая достоверность различий между средними величинами определена по t-критерию Стьюдента (* $P < 0.05$).

Анализ состояния генома с помощью метода ДНК-комет проводился параллельно; экспериментальный дизайн позволял выявить такие признаки дестабилизации генома, как повышенный уровень эндогенных повреждений ДНК, увеличенная чувствительность генома к окислительному стрессу, изменения кинетики репарации окислительных повреждений ДНК по сравнению с этими показателями у здоровых лиц [27]. Уровень эндогенных повреждений ДНК оценивали на 180-й мин инкубации интактных клеток; уровень индуцированных повреждений ДНК определяли сразу после обработки клеточной суспензии H_2O_2 . Кинетику элиминации индуцированных

повреждений ДНК и эффективность репарации ДНК анализировали при отборе проб на 0, 15, 30, 60, 120 и 180-й мин после окислительного стресса.

Первоначально на примере контрольной группы проанализировано возможное влияние возраста на частоту эндогенных и экзогенных повреждений ДНК. Данные корреляционного анализа, представленные на рисунке 1, показывают отсутствие выраженной зависимости указанных показателей от возраста. Таким образом, различия в возрастном составе групп пациентов и здоровых лиц в данном случае не являются принципиальными для сравнения результатов.

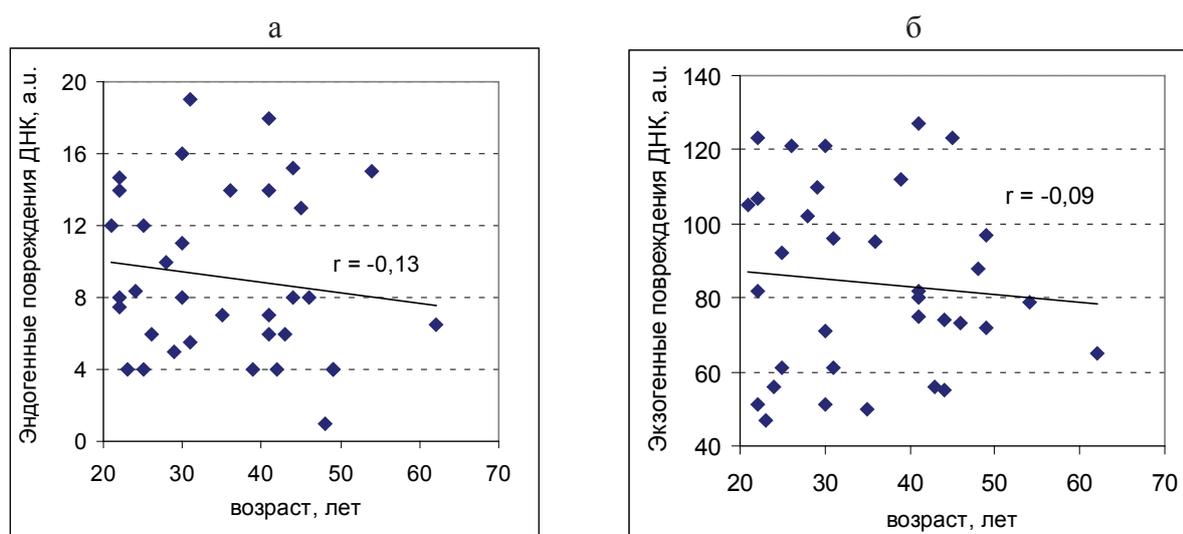


Рис. 1. Влияние возраста на показатели восприимчивости ДНК к эндогенным (а) и экзогенным (б) повреждениям.

В данном сообщении представлены и обсуждены результаты изучения состояния генома с помощью новой технологии у пациентов с СН, АФ, недифференцированным диагнозом СХН и их родителей. Следует отметить, что у пациента 7/665 (с недифференцированным диагнозом СХН) как в контроле, так и после мутагенной обработки наблюдалась массовая гибель лимфоцитов к концу инкубации, при

этом на 180-й мин частота эндогенных повреждений ДНК составляла 84 а.у. У отца и матери этого ребенка были зарегистрированы повышенные уровни эндогенных повреждений ДНК: 22 и 26 а.у. соответственно, при этом у отца эффективность репарации ДНК составляла на 15-й мин 55.9%, а на 180-й мин – 61.3% от первоначально индуцированного уровня повреждений.

Таблица 2

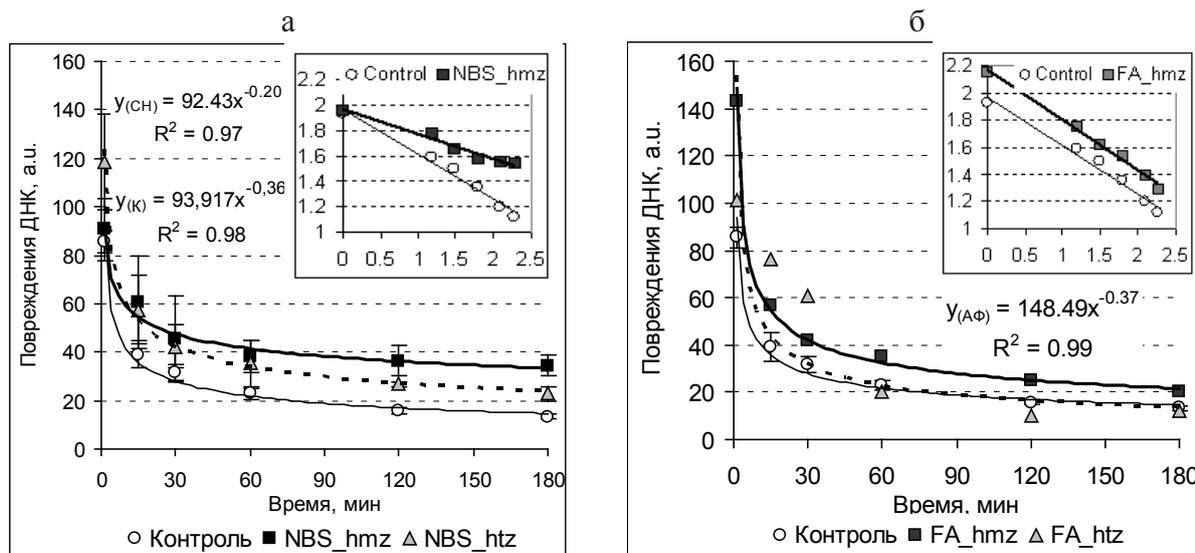
Уровень эндогенных и экзогенных повреждений ДНК в лимфоцитах гомозиготных и гетерозиготных носителей мутаций, ответственных за СХН

Группа	Количество обследованных лиц	Эндогенные повреждения ДНК, а.у.	Повреждения ДНК, индуцированные H ₂ O ₂ (100 мкМ), а.у.	
		180 мин	0 мин	180 мин
Контроль	37	9.13±0.79	85.63±4.38	13.32±1.07
СН (дети)	4	24.00±1.53*	90.67±12.81	34.50±4.50*#
СН (родители)	7	22.67±2.19*	93.00±8.00	23.33±2.96*
АФ (ребенок)	1	17.00	143.00*	20.00
АФ (мать)	1	13.00	101.0	12.0

Достоверность различий между группами пациентов и контролем, а также достоверные отличия остаточного уровня индуцированных повреждений ДНК от уровня эндогенных повреждений определены по t-критерию (* P<0.05; # P<0.05 соответственно).

Частота эндогенных повреждений ДНК у детей с СН и их родителей существенно (более чем в 2 раза) превышала контрольный уровень (таблица 2). В этих же группах частота экзогенных повреждений ДНК на 180 мин тоже была выше, чем у здоровых лиц. Следует отметить, что остаточный уровень индуцированных повреждений ДНК у детей с СН почти в 3 раза превосходил этот показатель в контрольной группе и был достоверно выше уровня

эндогенных повреждений в своей группе, что явно свидетельствовало о подавлении репарационного процесса. У ребенка с АФ зафиксирован высокий уровень индуцированных повреждений ДНК сразу после окислительного стресса и тенденция к повышению частоты эндогенных повреждений ДНК. У матери этого пациента все показатели, полученные с помощью метода ДНК-комет, находились в пределах нормы.



На вставках в рисунки (а) и (б) данные представлены в логарифмических координатах.

Рис. 2. Кинетика выхода индуцированных повреждений ДНК у гомо- (hmz) и потенциальных гетерозиготных (htz) носителей мутаций, ответственных за (а) синдром Ниймеген – NBS и (б) анемию Фанкони – FA

Характерно, что результаты этого анализа в целом согласуются с цитогенетическими данными, а именно: повышенная частота спонтанных aberrаций хромосом соответствует повышенным среднегрупповым уровням эндогенных повреждений ДНК и/или увеличенной чувствительности ДНК к окислительному стрессу у гомозиготных носителей мутаций, ответственных как за СН, так и АФ. У потенциальных гетерозиготных носителей мутации, связанной с СН, среднегрупповая частота спонтанных aberrаций хромосом также выше, чем в контрольной группе, что согласуется с увеличенным уровнем эндогенных и экзогенных повреждений ДНК к концу инкубации лимфоцитов. Следует отметить, что индивидуальные частоты эндогенных повреждений ДНК и остаточного уровня индуцированных повреждений ДНК у обследованных родителей не менее чем в полтора раза превышали аналогичные показатели в контрольной группе. Выявление признаков геномной нестабильности цитогенетическими методами и с помощью метода ДНК-комет у близких родственников пациентов с диагнозом СН имеет принципиальное значение, т.к. может указывать на гетерозиготное носительство соответствующей мутации, что сопряжено с повы-

шенным риском канцерогенеза [18].

На основании данных по одному гетерозиготному носителю мутаций, ответственных за АФ, невозможно сделать какого-либо заключения, но многие авторы разделяют мнение, что такие цитогенетические показатели, как частота спонтанных aberrаций хромосом и чувствительность к агентам, вызывающим сшивки ДНК, не позволяют отличать гетерозиготных носителей FANС-мутаций от здоровых индивидуумов [28–30].

Наибольший интерес с точки зрения диагностики геномной нестабильности при СН представляют результаты изучения кинетики репарации ДНК (рисунок 2), которая хорошо описывается уравнением степенной зависимости как в контрольной группе ($R_K = 0.98$), так и в группе детей с СН ($R_{CH} = 0.97$) и АФ ($R_{AF} = 0.99$). Видно, что при СН средние частоты индуцированных повреждений ДНК выше контрольных величин, начиная с 60-й мин инкубации обработанных пероксидом водорода лимфоцитов ($P=0.004$), и эти различия достигают максимума на 180 мин ($P=0.003$). У пациента с АФ во всех точках анализа наблюдается превышение контрольных значений: различия высоко достоверны на 0, 15, 30 и 60-й мин ($P<0.05$, $P=0.009$, $P=0.010$, $P<0.001$ соответственно) и находятся на грани достовер-

ности на 120 и 180-й мин ($P=0.056$, $P=0.057$). Кинетика репарации ДНК в течение 3-часового периода указывает на разные закономерности этого процесса при СН и АФ, которые становятся явными после логарифмирования данных. Вставки на рисунке 2 показывают, что угол наклона прямой, соответствующей СН, существенно отличается от угла наклона прямой, соответствующей контролю (а), тогда как при АФ он практически равен контрольному (б). Коэффициент линейной регрессии для СН (-0.196) существенно (при $P \ll 0.05$) отличается от этого показателя для АФ (-0.368) и контрольной группы (-0.356). Проведенный анализ подтверждает снижение скорости элиминации окислительных повреждений ДНК при СН и отсутствие каких-либо изменений этого процесса при АФ.

Расчеты эффективности репарации ДНК показали, что у пациентов с СН этот показатель снижен по сравнению с контролем, тогда как при АФ он аналогичен контрольному (рисунок 3). При СН за 3 часа после окислительного стресса элиминируется 60% индуцированных повреждений ДНК, тогда как у здоровых лиц такой же процент повреждений репарируется в течение первых 15 мин. Действительно, нет достоверных различий между показателями

эффективности репарации ДНК в группе пациентов с СН на 180-й мин и в контрольной группе на 15-й мин ($t=1.64$, $P>0.05$).

Наблюдаемые закономерности находят объяснение в свете современных данных об уникальных молекулярных механизмах и неравном вкладе метаболизма кислорода в патогенез этих заболеваний. Известно, что регуляция нибрином репарации двуниевых разрывов ДНК опосредована АТМ-киназой [31–33], которая в свою очередь вовлечена в клеточный ответ на окислительный стресс [34]. Показано, что АТМ-киназа может взаимодействовать с ДНК лигазой IIIα и протеином XRCC1, стимулирующими эксцизионную репарацию оснований (BER) и репарацию однониевых разрывов ДНК [35, 36]. Отсюда, при синдроме Ниймеген в результате дисбаланса Nbs 1 и АТМ можно ожидать какие-либо нарушения со стороны BER.

В отличие от СН многие фенотипические проявления АФ, особенно с возрастом, обусловлены окислительным стрессом, при этом активные формы кислорода (АФК) и соответствующие аддукты ДНК накапливаются не в результате нарушений BER [37], а вследствие несовершенства системы антиоксидантной защиты [38], улавливающей АФК еще до их взаимодействия с ДНК.

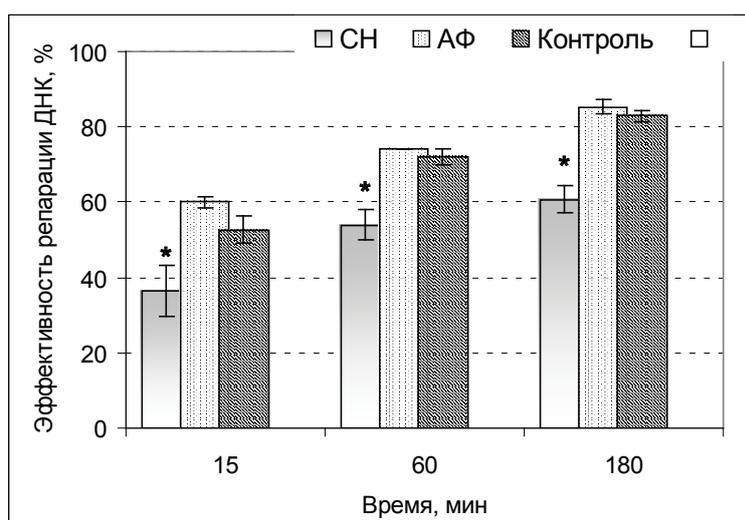


Рис. 3. Эффективность репарации ДНК относительно первоначально индуцированного уровня повреждений ДНК при СН и АФ

Применительно к нашему исследованию необходимо подчеркнуть, что пул регистрируемых повреждений ДНК был представлен преимуще-

ственно окислительными повреждениями, так как они индуцированы прооксидантом H_2O_2 . Известно, что АФК формируют специфические

аддукты ДНК, которые удаляются BER [39, 40]. Используемая технология выявила различия между двумя СХН как по реакции клеток на окислительный стресс *in vitro*, так и по элиминации окислительных повреждений в процессе репарации ДНК. Наблюдаемые закономерности вполне обоснованы. Замедление и снижение эффективности репарации ДНК при СН и нормальная репарация окисленных оснований ДНК

на фоне повышенной чувствительности генома к окислительному стрессу при АФ отражают различные патогенетические механизмы этих заболеваний. Метод ДНК-комет в сочетании с предложенным экспериментальным дизайном позволяет не только обнаружить геномную нестабильность, но и оценить вклад различных биологических процессов в развитие данных заболеваний.

Заключение

Новый подход, основанный на применении метода ДНК-комет, позволил выявить признаки дестабилизации генома у гомозиготных носителей мутаций, ассоциированных с синдромом Ниймеген и анемией Фанкони, а также в группе потенциальных гетерозиготных носителей мутации, ответственной за СН. Полученные данные соответствовали результатам цитогенетического анализа, однако метод ДНК-комет давал дополнительную возможность охарактеризовать процесс репарации ДНК, нарушения которого играют основополагающую роль в развитии синдромов хромосомной нестабильности. Установлено торможение и снижение эффективности репарации окислительных повреждений

ДНК при СН, что указывает на вероятность нарушения процесса эксцизионной репарации оснований дополнительно к известному дефекту репарации двунитевых разрывов ДНК при этом заболевании. Выявление признаков дестабилизации генома у родителей пациентов с СН подтверждает целесообразность использования новой технологии наравне с традиционным цитогенетическим анализом для диагностики геномной нестабильности как показателя гетерозиготного носительства соответствующей мутации, что имеет значение не только для генетического консультирования, но и для прогноза онкологического риска у членов семей больных с этим диагнозом.

Список литературы

1. Taylor A.M. Chromosome instability syndromes / A.M. Taylor // *Best Pract Clin Haematol.* – 2001. – Vol. 14. – P. 631–644.
2. Nijmegen breakage syndrome. / J.A. Hiel [et al.] // *Arch Dis Child.* 2000. – Vol. 82. – P. 400–406.
3. An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability / I. Demuth [et al.] // *Hum Mol Genet.* 2004. – Vol. 13, № 20. – P. 2385–2397.
4. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations / R. Varon [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2000. – Vol. 8, № 11. – P. 900–902.
5. Nijmegen breakage syndrome / I. Kondratenko [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2007. – Vol. 601. – P. 61–67.
6. Girard P-M. Radiosensitivity in Nijmegen breakage syndrome cells is attributable to a repair defect and not to cell cycle checkpoint defects / P-M. Girard, N. Foray, M. Stumm // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 4881–4888.
7. Gladkowska-Dura M. Malignant lymphoma in Nijmegen breakage syndrome / M. Gladkowska-Dura, K.H. Chrzanowska., W.T. Dura // *Ann. Pediatr. Pathol.* – 2000. – Vol. 4. – P. 39–46.
8. T-cell prolymphocytic leukemia with autoimmune manifestations in Nijmegen breakage syndrome / A.S. Michallet [et al.] // *Ann. Hematol.* – 2003. – Vol. 82, №8. – P. 515–517.
9. NBS1 and its functional role in the DNA damage response / J. Kobayashi [et al.] // *DNA Repair (Amst).* – 2004. – Vol. 3, № 8–9. – P. 855–861.
10. Tischkowitz M.D. Fanconi Anemia / M.D. Tischkowitz, S.V. Hodgson // *Journal of Medical Genetics.* – 2003. – Vol. 40. P. 1–10.
11. Kook H. Fanconi anemia: current management / H. Kook // *Hematology.* – 2005. –

Vol. 10, Suppl. 1. – P. 108–110.

12. Fanconi anemia FANCG protein in mitigating radiation- and enzyme-induced DNA double-strand breaks by homologous recombination in vertebrate cells / K. Yamamoto [et al.] // *Mol. Cell. Biology*. – 2003. – Vol. 23, №15. – P. 5421–5430.

13. Kennedy R.D. The Fanconi anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd / R.D. Kennedy, A.D. D'Andrea // *Genes & Development*. – 2005. – Vol. 19. – P. 2925–2940.

14. Wood R.D. Human DNA repair genes, 2005 / R.D. Wood, M. Mitchell, T. Lindahl // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 577, № 1–2. – P. 275–283.

15. Auerbach A.D. Fanconi anemia and its diagnosis / A.D. Auerbach // *Mutat. Res.* – 2009. – Vol. 668, №1-2. – P. 4–10.

16. Bloom syndrome and Fanconi's anemia: rate and ethnic origin of mutation carriers in Israel / L. Peleg [et al.] // *Isr. Med. Assoc. J.* – 2002. – Vol. 4, № 2. – P. 95–97.

17. Genetic heterogeneity among Fanconi anemia heterozygotes and risk of cancer / M. Berwick [et al.] // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 19. – P. 9591–9596.

18. di Masi A. NBS1 heterozygosity and cancer risk / A. di Masi, A. Antoccia // *Curr. Genomics* – 2008. – Vol. 9. – P. 275–281.

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. Biotechnology*. – 2004. – Vol. 26. – P. 249–261.

21. Shaffer L.G. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005): Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature / L.G. Shaffer, N. Tommerup // Basel: Karger, 2005. – 132 p.

22. Метод цитогенетической диагностики анемии Фанкони // Инструкция по применению. ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» / А.Д. Политыко [и др.] / Современные методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний. – 2008. – Выпуск 9. Т. 2. – С. 79–97.

23. Метод цитогенетической диагностики синдрома атаксии-телеангиэктазии

(Луи-Бар) и синдрома Ниймеген / Инструкция по применению. ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» / А.Д. Политыко [и др.] / Современные методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний. – 2008. – Выпуск 9, Т. 2. – С. 57–75.

24. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay / D. Anderson [et al.] // *Mutat. Res.* – 1994. – Vol. 307. – P. 261–271.

25. Популяционно-генетическая оценка среды обитания населения Беларуси: анализ цитогенетической нестабильности в различных контингентах / А.Д. Политыко [и др.] // Достижения медицинской науки Беларуси (Рецензируемый научный ежегодный сборник). – 2004. – Т. 9. – С. 24–25.

26. Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes / C. Tanzanella [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 11. – P. 297–303.

27. Анализ уровня aberrаций хромосом, эндогенных повреждений ДНК и чувствительности генома к окислительному стрессу в лимфоцитах человека / Р.И. Гончарова [и др.] // Вести НАНБ, сер. мед. наук. – 2008. – № 3. – С. 77–85.

28. Rosendorff J. Fanconi's anemia – chromosome breakage studies in homozygotes and heterozygotes / J. Rosendorff, R. Bernstein // *Cancer Genet Cytogenet* – 1988. – Vol. 33. – P. 175–183.

29. Fanconi anemia. A statistical evaluation of cytogenetic results obtained from South African families / T. Pearson T [et al.] // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2001. – Vol. 126. – P. 52–55.

30. Mohseni-Meybodi A. Cytogenetic sensitivity of G0 lymphocytes of Fanconi anemia patients and obligate carriers to mitomycin C and ionizing radiation / A. Mohseni-Meybodi, H. Mozdarani, P. Vosough // *Cytogenet. Genome Res.* – 2007. – Vol. 119. – P. 191–195.

31. Functional interaction of H2AX, NBS1, and p53 in ATM-dependent DNA damage responses and tumor suppression / J. Kang [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 661–670.

32. Characterization of an NBS1 C-terminal peptide that can inhibit ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage responses and enhance radiosensitivity /

- M.J. Cariveau [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 72. – P. 320–326.
33. Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes / K. Ito [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – P. 103–110.
34. Lee J.H. Dual role of Nbs1 in the ataxia telangiectasia mutated-dependent DNA damage response / J.H. Lee., D.S. Lim // *FEBS J.* – 2006. – Vol. 273, № 8. – P. 1630–1636.
35. Dong Z. ATM mediates oxidative stress-induced dephosphorylation of DNA ligase III α / Z. Dong, A.E. Tomkinson // *Nucl. Acids Res.* 2006. – Vol. 34. – P. 5721–5729.
36. Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair / W.C. Chou // *EMBO J.* – 2008. – Vol. 27. – P. 3140–3150.
37. Fanconi's anaemia cells have normal steady-state levels and repair of oxidative DNA base modifications sensitive to Fpg protein / Will O [et al.] // *Mutat Res.* – 1998. – Vol. 409. – P. 65–72.
38. Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype / G. Pagano [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 2005. – Vol. 75. – P. 93–100.
39. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective / T.K. Hazra [et al.] // *DNA Repair (Amst)* – 2007. – Vol. 6. – P. 470–480.
40. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging / S. Maynard [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2009. – Vol. 30. – P. 2–10.

Дата поступления статьи 16 июля 2010 г.

И.Б. Моссэ, А.Л. Гончар, К.В. Жур, М.Д. Амельянович, П.М. Морозик

СРАВНЕНИЕ ПОПУЛЯЦИОННЫХ ЧАСТОТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА ИНФАРКТА МИОКАРДА С УРОВНЯМИ ЭТОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ В РАЗНЫХ СТРАНАХ ЕВРОПЫ

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

Введение

Инфаркт миокарда (ИМ) относится к мультифакториальным заболеваниям, зависящим как от факторов окружающей среды, так и от генетических особенностей организма. Взаимодействие экологических и приобретенных факторов риска с генетическими факторами усложняет определение предрасположенности к данному роду заболеваний.

К настоящему времени выявлено несколько десятков генетических вариантов, носительство которых ассоциировано с развитием протромботических сдвигов в системе гемостаза. Нами показано [1,2], что генетическими факторами риска артериальных тромбозов являются Лейденская мутация (генотипы А/А, G/A), а также генотипы Leu/Leu по полиморфизму Val34Leu XIII-го фактора свертываемости крови и 4G/4G по инсерции/делеции 4G/5G гена PAI-1.

Лейденская мутация V-го фактора свертывания крови является известным фактором предрасположенности к венозным тромбозам. Роль ее в артериальном тромбообразовании не выяснена. Фактор V свертывания крови является белковым кофактором при образовании тромбина из протромбина. Полиморфизм G1691A Leiden (аминокислотная замена Arg (R) -> Gln (Q) в позиции 506) является доминантной точечной (однонуклеотидной) мутацией гена, кодирующего фактор V свертывания крови. Придает устойчивость активной форме фактора V к расщепляющему действию специализированного регулирующего фермента, С-белка, что приводит к гиперкоагуляции. Соответственно, риск образования тромбов повышается.

Нами выявлена повышенная в 2,3 раза частота мутации FactorV Leiden в группе пациентов с инфарктом миокарда по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о том, что данная мутация является фактором риска инфаркта миокарда [1].

XIII фактор свертывания крови - это гетеротетрамер, состоящий из двух каталитических субъединиц (альфа субъединицы) массой 83,2 килодальтона и двух неэнзиматических субъединиц (бета - субъединицы) массой 79,7 килодальтона, которые нековалентно объединены в тетрамерную молекулу массой 325,8 килодальтон. После активации тромбином, фактор XIII катализирует образование ковалентных связей между альфа- и гамма-цепями фибрина, стабилизируя таким образом фибриновый сгусток.

Фибриноген синтезируется в печени, его повышенные уровни в плазме крови могут отражать воспаленное состояние сосудистой стенки, и таким образом он может быть связан с риском возникновения сердечнососудистых заболеваний.

XIII фактор свертываемости крови является тромбин активируемым протеином, ответственным за сшивку гамма - цепей мономера фибрина и стабилизацию фибринового тромба. После активации тромбином, XIII фактор катализирует образование ковалентных мостиков между альфа - и гамма - цепями соседних мономеров фибрина, таким образом стабилизируя тромб.

Стабилизация фибринового сгустка выполняется посредством транслугтаминазной реакции, которая формирует ковалентные

мостики между лизиновым и глутаминовым сайтами цепи фибрина. В соответствии с тромб-стабилизирующей ролью, недостаточность XIII фактора оборачивается серьезными осложнениями, связанными с чрезмерным кровотечением.

Для альфа-субъединицы XIII фактора обнаружено 5 полиморфных вариантов. Наиболее известным является полиморфизм Val34Leu [3]. Он заключается в замене валина на лейцин во втором экзоне гена в позиции 34 полипептидной цепи, всего в трех аминокислотных остатках от сайта рестрикции.

Полиморфизм Val34Leu XIII-го фактора свертывания крови оказывает влияние на активность и структуру фибриногена — белка, участвующего в процессе тромбообразования на конечных стадиях коагуляционного каскада и, соответственно, влияющего на прочность и эластичность тромба [4-7].

Замена валина на лейцин ассоциирована с повышенной активацией XIII фактора тромбина и повышенной линкерной активностью. Полиморфизм Val34Leu не меняет уровень концентрации XIII фактора, однако изменяет его активность.

Замена валина на лейцин является малозначимой — единственная разница между этими аминокислотами заключается в дополнительной СН₂ группе в боковой цепи лейцина — полиморфизм Val34Leu оказывает значительный эффект на функцию XIII фактора.

Изоформа 34Leu быстрее активирована тромбином, обладает повышенной в 2,5 раза каталитической эффективностью и сокращенным временем образования тромба по сравнению с изоформой 34Val (с 0,2 М за секунду у Val34 до 0,5 М за секунду у Leu34) [8].

Механизм, благодаря которому замена валина на лейцин в 34 положении полипептидной цепи ускоряет активацию тромбином, пока не выяснен. Sadasivan и Yee проанализировали взаимодействие между тромбином и полипептидом XIII фактора с помощью рентгеноструктурной кристаллографии и подтвердили важную роль в этом взаимодействии аминокислотного остатка в положении 34 полипептидной цепи [6].

Выявленное нами увеличение в 2,5 раза частоты гомозигот по аллелю 34Leu у пациентов, перенесших инфаркт миокарда, по сравнению

с контрольной группой может свидетельствовать о повышенном риске этого заболевания у людей с генотипом LL [9].

Полиморфизм 4G/5G гена PAI-1 (ингибитора активатора плазминогена 1, одного из основных компонентов тромболитической плазминоген-плазминовой системы) широко изучается в связи с риском развития острой сосудисто-коронарной патологии, венозного тромбоза, эклампсии и других сосудистых расстройств.

Показано, что уровень PAI-1 в плазме крови ассоциирован с полиморфизмом в области промотора гена PAI-1, представляющего собой однонуклеотидную делецию/инсерцию гуанина (4G/5G). Люди, гомозиготные по 4G аллелю, обладают более высоким уровнем содержания PAI-1 в плазме, а гомозиготные по 5G аллелю, более низким. Механизм, лежащий в основе аллельных различий в уровне синтеза PAI-1, был установлен после обнаружения того, что оба аллеля могут связываться с активатором транскрипции гена, тогда как аллель 5G также имеет сайт связывания с транскрипционным репрессором. Отсутствие действия репрессора и обеспечивает более высокий уровень транскрипции гена PAI-1 с аллелем 4G.

В норме в крови находится неактивный предшественник плазмина плазминоген. Активаторов плазминогена в организме достаточно много. Одним из основных компонентов антисвертывающей системы крови является ингибитор активатора плазминогена (PAI-1) [10]. Этот белок регулирует тканевый и урокиназный активаторы плазминогена PAI-1, обеспечивает до 60% общей ингибиторной активности в отношении активатора плазминогена в плазме и тем самым играет важную роль в регуляции фибринолиза. Повышение уровня PAI-1 связано с увеличением риска тромбозов [11].

Влияние 4G/5G полиморфизма гена PAI-1 на риск развития инфаркта миокарда до сих пор точно не установлено. Некоторые результаты свидетельствуют о том, что генотип 4G/4G обуславливает повышенный риск инфаркта миокарда [12], но в то же время имеются сообщения, что этот генотип является нейтральным [13] или даже протекторным [14].

В целом отмечена тенденция к увеличению доли гомозигот по «тромбофильному» аллелю

(4G/4G) среди больных по сравнению с контрольной выборкой [15]. Вариант 4G приводит к повышенной экспрессии гена и, следовательно, к повышенному уровню PAI1 в крови. Следовательно, тромболитическая система заторможена и риск тромбообразования возрастает.

Нами показано, что генотип 4G/4G гена PAI-

1 может являться предрасполагающим к возникновению ОИМ, а 5G/5G-протекторным [2].

Целью данной работы является сравнение частот выявленных генетических факторов риска в популяциях разных стран Европы с уровнем заболеваемости инфарктом миокарда в этих странах.

Материалы и методы

Для определения частот полиморфных аллелей генов риска в популяции Беларуси была сформирована группа в количестве 150 человек. В качестве биологического материала для исследования была использована ДНК, экстрагированная из пятен крови, высушенных на специальных бланках.

Для определения аллелей полиморфизма XIII фактора свертываемости крови Val34Leu была разработана методика на основе принципа Tetra-primer ARMS, суть которой заключается в использовании двух пар праймеров - внешних и внутренних. Внутренние праймеры являются аллель-специфичными, а внешние ограничивают сайт мутации таким образом, что при разделении продуктов ПЦР с помощью электрофореза разным аллелям соответ-

ствуют полосы различной длины [9]

Идентификацию мутации Factor V Leiden (FVL) проводили методом ARMS. Разделение продуктов ПЦР осуществляли с помощью электрофореза в 2-процентном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием [1].

Для анализа полиморфизмов 4G/5G промоторной области гена PAI-1 была разработана оригинальная методика с использованием автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием [2].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета анализа данных Microsoft Excel. Для определения взаимосвязи между двумя параметрами рассчитывали коэффициент корреляции.

Результаты и обсуждения

Популяционное распределение генотипов и аллелей полиморфизма Val34Leu

Исследовано 110 образцов крови контрольной группы (220 хромосом). Обнаружено 43,6 %

гомозиготных и 52,7 % гетерозиготных носителей аллеля V. В то же время частоты аллелей полиморфизма Val34Leu составили 69,1 % аллеля V и 30,9 % аллеля L (таблица 1).

Таблица 1

Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов Val34Leu

Группы	Генотип			Аллели	
	VV	VL	LL	V	L
контрольная группа	N=110			N=220	
	48 (43,6%)	58 (52,7%)	4 (3,7%)	152 (69,1%)	68 (30,9%)

Определение частоты мутации Factor V Leiden

Поиск мутации Factor V Leiden выполнен в группе, состоящей из 100 человек, было обнаружено 3 гетерозиготных носителя данной мутации, то есть частота мутации Factor V Leiden составила 3 % (таблица 2). Гомозиготных носителей данной мутации выявлено не было.

ружено 3 гетерозиготных носителя данной мутации, то есть частота мутации Factor V Leiden составила 3 % (таблица 2). Гомозиготных носителей данной мутации выявлено не было.

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей Factor V Leiden

Группы	Генотип			Аллели	
	GG	GA	AA	G	A
контрольная группа	N=100			N=200	
	97 (97%)	3 (3%)	0 (0%)	197 (98,5%)	3 (1,5%)

Популяционное распределение генотипов и аллелей гена PAI-1

Исследована контрольная группа из 150 человек (300 хромосом). Частота аллеля 4G составила 54,1 %. Выявлено 43 (28,7 %) го-

мозиготных носителя и 75 (50 %) гетерозиготных носителей данного аллеля. Частота аллеля 5G составила 46,3 %. В гомозиготном состоянии он был выявлен у 32 (21,3 %) человек (таблица 3).

Таблица 3

Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов 4G/5G гена PAI-1

Группы	Генотип			Аллели	
	4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G	5G
контрольная группа	N=150			N=300	
	43 (28,7%)	75 (50,0%)	32 (21,3%)	161 (54,1%)	139 (45,9%)

Сравнение частоты исследованных генетических факторов риска в популяциях Беларуси и разных стран Европы с уровнем заболеваемости инфарктом миокарда в этих странах

Проведено сравнение популяционных частот генотипов и полиморфных аллелей Val34Leu XIII-го фактора свертывания крови, 4G/5G гена PAI-1 и мутации Factor V Leiden V-го фактора свертывания крови в разных странах Европы с уровнем заболеваемости инфарктом миокарда в этих странах. Частота возникновения инфаркта миокарда в странах Европы

представлена на графике, изображенном на рис. 1. Данный график построен на основании проанализированных данных сайта Всемирной Организации Здравоохранения [16].

Самая низкая частота инфаркта миокарда выявлена в Испании, она составляет 0,78 %, самая высокая частота – 2,31% обнаружена в популяции России. Для Греции, Швеции, Италии и Беларуси характерен средний уровень возникновения инфаркта миокарда, в то время как для Польши и Хорватии - ниже среднего.

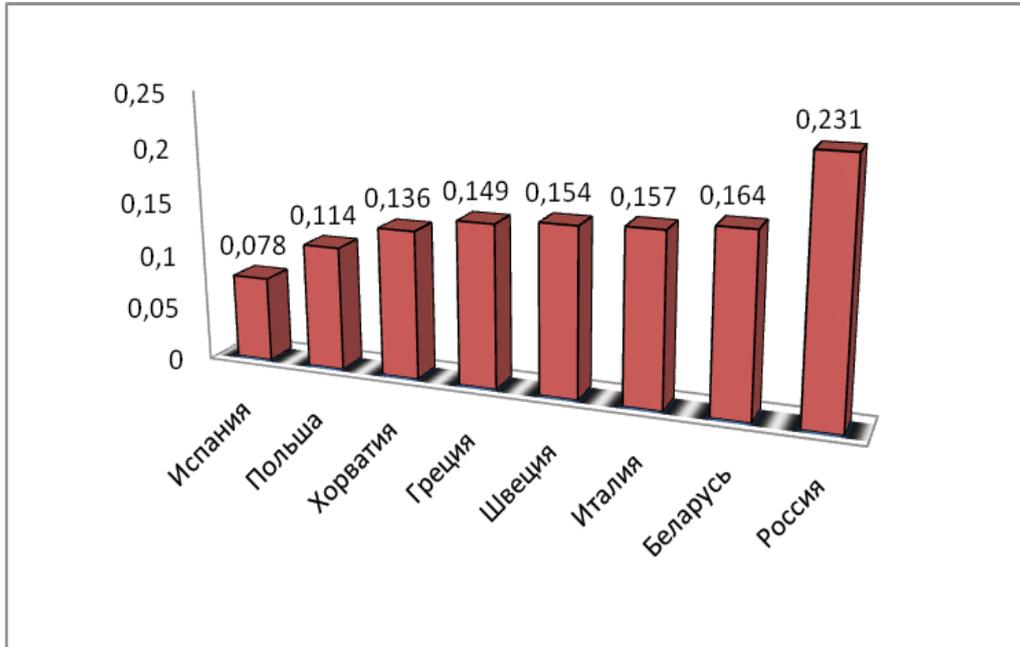


Рис. 1. Частота возникновения инфаркта миокарда среди жителей ряда стран Европы по данным на 2008 год (в процентах) [16].

На основании проведенного анализа литературных данных, получены следующие частоты генотипа Leu/Leu, представленные на рис.

2: Испания – 3,6 % [17], Хорватия – 7 % [18], Греция – 6 % [19], Швеция – 7,1 % [20], Италия – 6,5 % [21], Беларусь – 6 % [2].

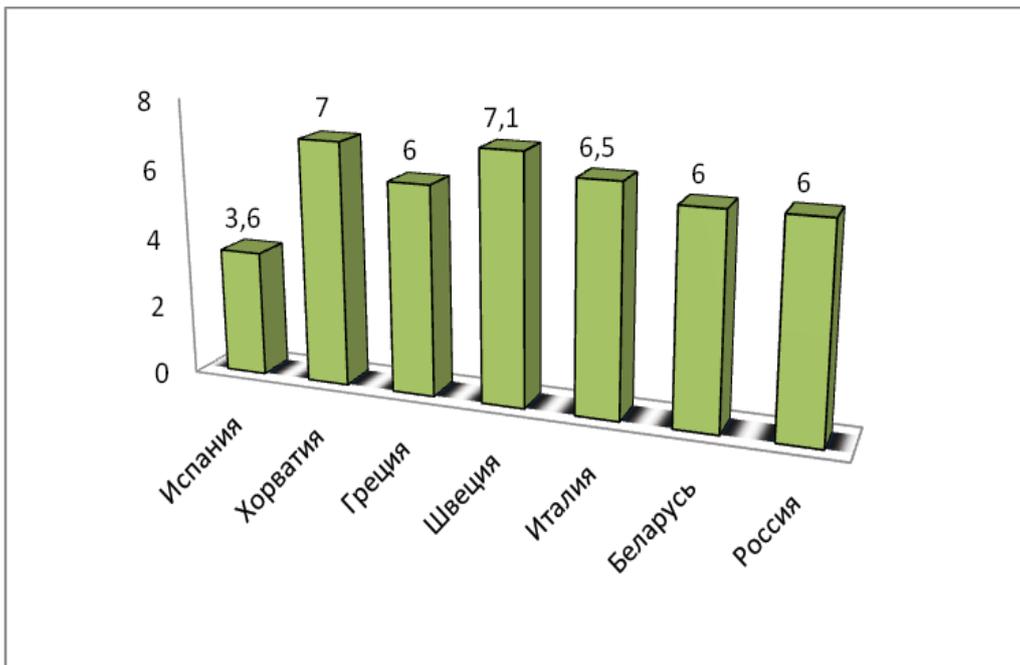


Рис. 2. Сравнительный анализ распределения частоты генотипа Leu/Leu в ряде стран Европы (в процентах).

Данные по частотам мутации Factor V Leiden в популяциях разных стран представлены на рис. 3: Испания – 2 % [22], Хорватия – 3,9 % [23], Греция – 5 % [24], Швеция – 11% [25], Италия – 3 % [26], Беларусь – 2,6%

[1], Россия – 2,6 % [27].

Частоты генотипа 4G/4G представлены на рисунке 4: Швеция - 11 % [28,29], Италия – 3% [30], Беларусь – 2,6 % [2], Россия – 2,6 % [31], Польша – 3 % [32,33].

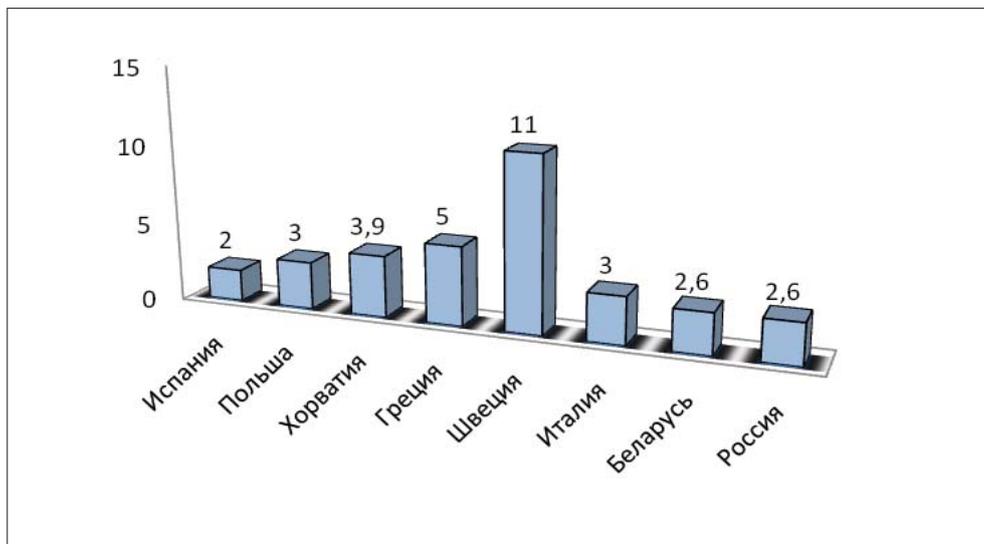


Рис. 3. Сравнительный анализ распределения частоты мутации Factor V Leiden в ряде стран Европы (в процентах).

Сравнивая частоты выявленных генетических факторов риска в популяциях разных стран Европы, можно отметить, что в Беларуси частоты генотипов риска для полиморфных

вариантов Val34Leu (рис. 2) и 4G/5G (рис. 4) находятся на среднем для Европы уровне, а частота мутации Factor V Leiden – на уровне ниже среднего (рис. 3).



Рис. 4. Сравнительный анализ распределения частоты генотипа 4G/4G в ряде стран Европы (в процентах).

На рис. 5 представлен сравнительный анализ частот генотипов риска ИМ с уровнями этого заболевания в ряде стран Европы. В ходе статистического анализа данных была выявлена достоверная положительная корреляционная зависимость между частотой заболеваемости ИМ и частотой генотипа 4G/4G ($r=0,8871$, $P<0,0447$).

Таким образом, при сравнении генетических данных показано, что более высокая частота генотипа 4G/4G в популяции соответствует более высокой частоте заболевания ИМ, что свидетельствует о том, что данный генотип вносит существенный вклад в развитие заболевания, что согласуется с данными литературы по другим странам. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что генотип 4G/4G гена PAI-1 является наиболее информативным для определения генетической предрасположенности к ИМ.

В то же время для частот генотипов и полиморфных аллелей Val34Leu XIII-го фактора свертывания крови и мутации Factor V Leiden V-го фактора свертывания крови достоверной

корреляции с частотой возникновения инфаркта миокарда не наблюдалось.

Так, в России при высокой частоте ИМ только частота генотипа 4G/4G из рассматриваемых нами полиморфных вариантов превышает среднеевропейский уровень.

В то же время в Швеции при более высокой частоте генетических факторов риска наблюдаемая частота ИМ даже ниже, чем в Беларуси.

Известно, что в возникновении инфаркта миокарда большое значение имеют средовые факторы риска, такие как гиподинамия, стрессы, курение, диабет, гипертония и другие. Большинство перечисленных факторов связаны с уровнем социального и экономического развития страны, поэтому частота заболеваний во многом зависит от образа жизни людей в разных странах и может не совпадать с частотой генетических факторов риска.

Понятно, что к серьезному увеличению риска инфаркта миокарда приводят не отдельные аллели, а их сочетание в генотипе индивидуума, а также взаимодействие со средовыми факторами.

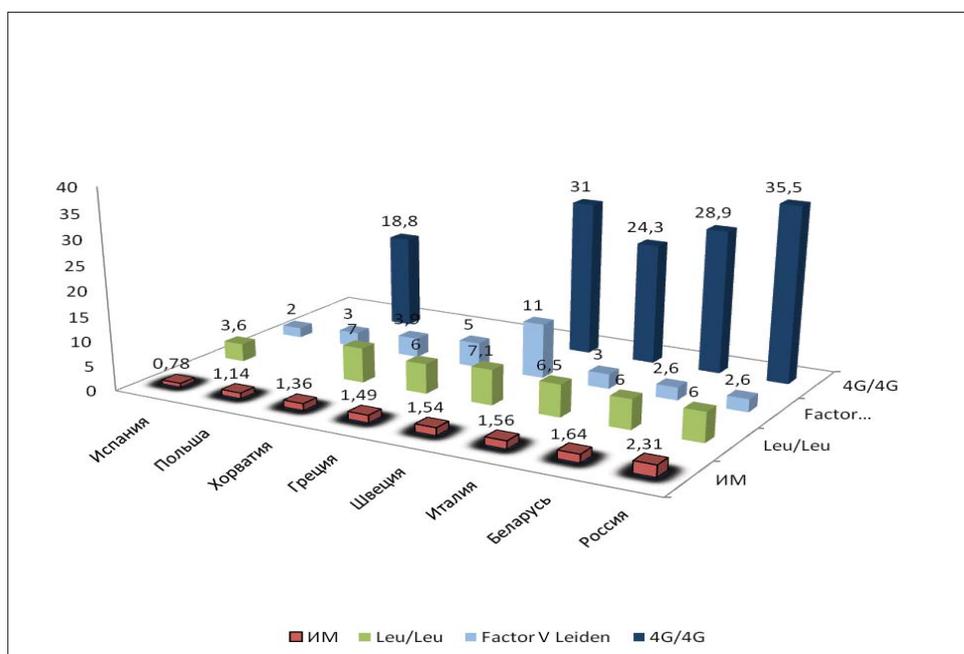


Рис. 5. Сравнение частот генотипов риска ИМ с уровнями этого заболевания в разных странах (в процентах).

Заключение

В результате проведенного исследования установлены популяционные частоты генотипов и полиморфных аллелей риска ИМ: Val34Leu XIII-го фактора свертывания крови, 4G/5G гена PAI-1 и мутации Factor V Leiden V-го фактора свертывания крови в популяции Беларуси.

В Беларуси частоты генотипов риска для полиморфных вариантов Leu34Leu и 4G/4G находятся на среднем для Европы уровне, 6 % и 28,9% соответственно, а частота мутации Factor V Leiden на уровне ниже среднего – 2,6%.

Полученные данные по частотам генотипов риска ИМ в Беларуси соотнесли с частотами возникновения инфаркта миокарда в Беларуси и сравнили с соответствующими данными других стран Европы. Самая низкая частота инфаркта миокарда выявлена в Испании, она составляет 0,78 %, самая высокая частота – 2,31% – обнаружена в популяции России. Для Греции, Швеции, Италии и Беларуси характерен средний уровень возникновения инфаркта миокарда, в то время как для Польши и Хорватии – ниже среднего.

В ходе статистического анализа данных была выявлена достоверная положительная корреляционная зависимость между частотой заболеваемости ИМ и частотой генотипа 4G/4G. В то же время для частот генотипов и полиморфных аллелей Val34Leu XIII-го фактора свертывания крови и мутации Factor V Leiden V-го фактора свертывания крови достоверной корреляции с частотой возникновения инфаркта миокарда не наблюдалось.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что генотип 4G/4G гена PAI-1 является наиболее информативным для определения генетической предрасположенности к ИМ.

Известно, что в возникновении инфаркта миокарда большое значение имеют средовые факторы риска, такие как гиподинамия, стрессы, курение, диабет, гипертония и другие. Большинство перечисленных факторов связаны с уровнем социального и экономического развития страны, поэтому частота заболеваний во многом зависит от образа жизни людей в разных странах и может не совпадать с частотой генетических факторов риска.

Список использованной литературы

1. Ассоциация полиморфных вариантов гена PAI-1 и мутации Factor V Leiden с генетической предрасположенностью к инфаркту миокарда / А.Л. Гончар [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. – 2009. – № 1. – С. 114–120.
2. Полиморфные варианты генов системы тромбообразования и их роль в развитии инфаркта миокарда / А.Л. Гончар [и др.] // Артериальная гипертензия. – 2009. – Т. 15, № 4. – С. 466–469.
3. Modulation of the risk of coronary sclerosis/myocardial infarction by the interaction between factor XIII subunit A Val34Leu polymorphism and fibrinogen concentration in the high risk Hungarian population / E. Balog [et al.] // Thrombosis Research. – 2007. – Vol. 120. – P. 567–573.
4. Factor XIII Val34Leu variant and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis / M. Shafey [et al.] // PubMed. – 2007. – Vol. 97. – P. 635–641.
5. Factor XIII Val34Leu polymorphism and the risk of myocardial infarction / L. S. Rallidis, M. // Thromb. Haemost. – 2008. – Vol. 99. – P. 1085–1089.
6. Sadasivan, C. Interaction of the factor XIII activation peptide with thrombin / C. Sadasivan, V. C. Yee // J Biol Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 362–368.
7. Joint linkage and association of six single-nucleotide polymorphisms in the factor XIII-A subunit gene point to Val34Leu as the main functional locus / M. de Lange [et al.] // Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology. – 2006. – Vol. 26. – P. 1914–1919.
8. Mansilha, A. The association between the Val34Leu mutation in the factor XIII gene and deep venous thrombosis in young people / A. Mansilha, F. Araujo // Dialnet. – 2009. – Vol. 12. – P. 5–8.
9. Молекулярно-генетический анализ полиморфизмов Thr312Ala и Val34Leu как факторов риска инфаркта миокарда / А.Л. Гончар [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. – 2008. – С. 75–80.
10. Saksela, O. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiologic functions / O. Saksela, D.B. Rifkin // Annu Rev Cell Biol. – 1988. – № 4. – P. 93–126.
11. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries / J. Schneiderman [et al.] // Proc Natl

Acad Sci USA. – 1992. – № 89. – P. 6998–7002.

12. Allele specific increase in basal transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with myocardial infarction / P. Eriksson [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 1995. – № 92. – P. 1851–1855.

13. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review / S.M. Boekholdt [et al.] // Circulation. – 2001. – № 104. – P. 3063–3068.

14. The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction / C.J. Doggen [et al.] // Thromb Haemost. – 1999. – № 82. – P. 115–120.

15. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly / T. Hoekstra [et al.] // Stroke. – 2003. – № 34. – P. 2822–2828.

16. Сайт Всемирной Организации Здравоохранения [Электронный ресурс] / Европейская база данных «здоровье для всех». – Минск. – 2010. – Режим доступа: <http://www.euro.who.int/hfad?language=Russian>.

17. Corral, J. Factor XIII Val34Leu polymorphism in primary intracerebral haemorrhage / J. Corral, J. A. Iniesta // The hematology journal. – 2000. – Vol. 1. – P. 269–273.

18. Factor XIII Val34Leu Polymorphism in Croatian Population / A. Bronić [et al.] // XX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Sydney, 06.–12.08.2005 – Sydney, 2005. – С. 69–75.

19. Mutations and Polymorphisms in Genes Affecting Haemostasis Components in Children with Thromboembolic Events / A. Komitopoulou [et al.] // Pathophysiol. Haemos. Thromb. – 2006. – Vol. 35. – P. 392–397.

20. The genetics of haemostasis: a twin study / M. de Lange [et al.] // The Lancet. – 2004. – Vol. 357. – P. 101–105.

21. Polymorphisms in the Coagulation Factor VII Gene and the Risk of Myocardial Infarction / L. Iacoviello [et al.] // The new England journal of medicine. – 2000. – Vol. 338. – P. 79–85.

22. Lucotte, G. Population genetics of factor V Leiden in Europe / G. Lucotte, G. Mercier // Blood cells, molecules and diseases. – 2001. – Vol. 27. – P. 362–367.

23. -455G/A [beta]-fibrinogen gene

polymorphism, factor V Leiden, prothrombin G20210A mutation and MTHFR C677T, and placental vascular complications / R. S. Camilleri [et al.] // Blood coagulation and fibrinolysis. – 2004. – Vol. 15. – P. 139–147.

24. Prevalence of prothrombotic polymorphisms in Greece / A. Gialeraki [et al.] // Genetic testing. – 2008. – Vol. 12. – P. 541–547.

25. Factor V Leiden gene mutation and thrombin generation in relation to the development of acute stroke / A. Catto [et al.] // Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology. – 2004. – Vol. 17. – P. 783–785.

26. World distribution of factor V Leiden / D. C. Rees [et al.] // The Lancet. – 2002. – Vol. 346. – P. 1133–1134.

27. Age as a risk factor for myocardial infarction in Leiden mutation carriers / S. Baranovskaya [et al.] // Molecular genetics and metabolism. – 2006. – Vol. 84. – P. 155–157.

28. Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke / K. Jood [et al.] // Stroke. – 2005. – № 36ю – P. 2077–2081.

29. Cohorts replicated findings in two nested case-control studies based on independent plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of stroke / P.-G. Wiklund [et al.] // Stroke. – 2005. – № 36. – P. 1661–1665.

30. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease / M. Margaglione [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998. – № 18. – P. 152–156.

31. Капустин, С.И. Молекулярно-генетические аспекты патогенеза венозного тромбоза: автореф. дис. д-ра биол. наук.: 14.00.29; 03.00.04 / С.И. Капустин; Рос. науч.-исслед. ин-т гематологии и трансфузиологии РФ. – СПб., 2007. – 294 с.

32. Plasminogen-activator-inhibitor-1 promoter polymorphism as a risk factor for adult periodontitis in non-smokers / L. Izakovicova-Holla [et al.] // Genes and Immunity. – 2002. – № 3. – P. 292–294.

33. Blasiak, J. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer / J. Blasiak, B. Smolarz // Acta Biochimica Polonica. – 2000. – № 47. – P. 191–199.

Дата поступления статьи 16 июля 2010 г.

МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ У ЛЮПИНА (*LUPINUS L.*): СОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ КАРТ

Белорусский Государственный университет, Биологический факультет пр-т
Республика Беларусь, Минск, 220030, Независимости, 4

Введение

Появление молекулярных методик тестирования биологических объектов позволило применить новые подходы к решению многих биологических задач и внести коррективы в понимание основных процессов жизни. Широкое их использование позволяет определять на молекулярном уровне генетическую изменчивость растений, устанавливать генетические дистанции между видами, родами и другими таксономическими группами растений, проводить идентификацию и паспортизацию ценных генотипов, создавать генетические карты, вносить новые элементы в классификацию и филогению растений и т.д. Общеизвестно громадное значение молекулярных технологий в повышении эффективности селекционных программ у сельскохозяйственных растений посредством создания и использования в селекции молекулярных маркеров (MAS - Marker-Assisted Selection), тесно сцепленных с генами, обуславливающими хозяйственно ценные признаки. Поэтому огромные усилия и инвестиции в мире направлены на поиск моле-

кулярных маркеров для широкого использования их в селекционных программах растений и в частности люпина. Однако, как отмечается в работе [1] в начале этого века имелось только несколько случаев применения таких маркеров в селекции, а маркеры, использованные при создании новых районированных сортов, вообще редкое явление. Такого рода работы по культуре люпина наиболее интенсивно проводятся в таких странах, как Австралия, Германия, Польша. В частности, в Австралии исследования направлены на разработку молекулярных маркеров для использования в селекции. В странах СНГ молекулярному направлению исследований у люпина уделяется мало внимания, и работы с использованием молекулярных технологий применительно к этой культуре практически отсутствуют. В данной статье мы приводим в основном обзор работ зарубежных авторов, исследования которых связаны с развитием и использованием молекулярных методов у люпина, имеющих фундаментальное и практическое значение.

Материалы и методы

В обзоре проанализированы материалы научных статей (в основном зарубежных исследователей), касающиеся создания и применения молекулярных маркеров, сцепленных с генами, обуславливающими хозяйственно ценные признаки у рода люпина (*Lupinus L.*). Обсуждаются прикладные аспекты использования молекулярных маркеров для идентификации и отбора желательных генотипов в селекционных программах люпина. Приводятся имеющиеся сведения о структуре и

функции генома люпина и построении генетических карт.

1. Создание и использование молекулярных маркеров у люпина

Наиболее сложной задачей при создании маркеров для использования в практической селекции, является то, что такой маркер должен быть, как можно теснее, сцеплен с интересующим селекционера геном, и в то же время низкочувствительным в применении к

широкому кругу селекционных популяций и образцов [2, 3].

Серьезная проблема заключается также в необходимости совпадения бандов маркерных аллелей, сцепленных с желательным геном, с фенотипическим проявлением признака, контролируемого этим геном [3, 4]. К сожалению, большинство молекулярных маркеров, созданных для использования в селекции, несовершенны, они не являются частью самого гена, и существует определенная генетическая дистанция между молекулярными маркерами и желательными генами [2, 3]. В результате могут возникать в процессе селекции генетические рекомбинации между маркером и самим геном в соответствующем районе хромосомы. В этом случае образцы растений, показывающие желательные маркеры, не обязательно могут обладать интересующими селекционера генами в результате образования так называемых «ложных позитивов» [3, 5]. Очевидно, что чем больше выявляется «ложных позитивов» в селекционном генофонде, тем к меньшему числу образцов может быть эффективно применен такой маркер для скрининга этого материала [3, 6]. Действительно, для того чтобы решить проблему «ложных позитивов» у селекционных линий, молекулярные биологи вынуждены подтверждать пригодность молекулярных маркеров на многих образцах растений до того, как этот маркер поступит в широкое использование в селекции [3]. Например, в австралийской программе использования молекулярных маркеров у озимой пшеницы (AWMMP), большая доля ресурсов в решении проблемы широкого применения в селекции молекулярных маркеров затрачивается на «подтверждение маркера» [6, 7]. К успешным маркерам, используемым в программе (AWMMP), относятся два маркера, сцепленные с геном устойчивости к нематоде зерновых (CCN)[8]. В настоящее время общепризнано, что ограничения, связанные с невозможностью применять молекулярный маркер к широкому кругу образцов в селекционных программах, является главным лимитирующим фактором для широкомасштабного его использования в селекции растений [9].

Следует отметить, что наиболее интенсивно проводится работа по созданию молекулярных маркеров для селекционных программ, на-

правленных на повышение устойчивости растений люпина к заболеваниям. Выращивание устойчивых сортов – единственный и экономически выгодный способ борьбы против некоторых наиболее распространенных патогенов. И хотя в создании устойчивых сортов люпина к болезням уже сейчас достигнуты значительные успехи, но возникают новые патогены и новые расы старых, и проблема устойчивости растений вряд когда-нибудь будет снята с повестки дня. Наиболее серьезным заболеванием люпина, вызываемым грибным патогеном *Colletotrichum sp.*, является антракноз, повсеместно распространенный в тех странах, где выращивается люпин. Однако генетика устойчивости к антракнозу до сих пор является слабо изученной. По мнению некоторых исследователей, устойчивость к антракнозу у люпина узколистного является доминантным признаком, который контролируется у изученных ими образцов блоками из трех доминантных генов. Поиск новых неаллельных генов устойчивости к антракнозу среди селекционного и коллекционного материала с целью использования их в процессе создания иммунных сортов является важной задачей селекции [10]. Не менее важным звеном селекционных программ люпина является распознавание и отбор устойчивых к этому заболеванию генотипов. Поэтому повышение эффективности селекционных программ в этом отношении связывается с созданием и использованием молекулярных маркеров, тесно сцепленных с критическими генами устойчивости.

В Австралии наиболее устойчивыми к антракнозу являются два сестринских сорта люпина узколистного, Tanjil и Wonga, обладающие основным доминантным геном *Lanr1*, геном высокой резистентности к антракнозу. Первый молекулярный маркер *Antj M1*, сцепленный с геном *Lanr1*, показал аллельный банд устойчивости у ряда сортов, не обладающих геном *Lanr1* [11, 12], что в значительной степени ограничило его использование в селекционных программах, основанных на применении молекулярных маркеров [3]. Поэтому исследователи продолжали поиск другого молекулярного маркера, и такой маркер (*Antj M2*) был создан [5], он обладал типом банды, соответствующим фенотипу растения в отношении изучаемой болезни у всех сортов и селекци-

онных линий. Как оказалось, этот маркер был пригоден для широкого использования в австралийской селекционной программе люпина [12]. Опыт на люпине с маркерами *Antj M1* и *Antj M2* [3] доказал, что более целесообразно предварительно проверять многочисленные кандидаты в молекулярные маркеры на большом количестве растительных образцов. На базе экспериментальных проверок кандидатов в маркеры следует выбирать самый лучший вариант для конвертирования его в простой, основанный на ПЦР, маркер для рутинного использования в селекционных программах.

В исследовании [3] была использована представительная выборка растений F_2 гибрида, полученного от скрещивания сортов люпина узколистного Mandalup (устойчивого к антракнозу) и Quilnock (чувствительного) для фингерпринтинга посредством молекулярной методики MFLP (Microsatellite-anchored Fragment Length Polimorphism). В процессе выполнения данной работы было идентифицировано девять кандидатов в маркеры MFLP, сцепленных с геном устойчивости к антракнозу. Данные кандидаты в маркеры были проверены на 17 коммерческих сортах. Количество «ложных позитивов» (показывающих банды наличия резистентных аллелей при отсутствии гена R устойчивости к антракнозу) для каждого из девяти кандидатов в MFLP маркеры варьировало от 1 до 9. В результате этого тестирования был выбран лишь один кандидат в маркеры с наименьшим числом «ложных позитивов». Он был секвенирован и конвертирован в доминантный, секвенс-специфический простой ПЦР маркер, пригодный для рутинного применения в селекционных программах люпина. Тестирование 180 растений F_2 подтвердило, что конвертированный маркер сцеплен с геном R, устойчивости к антракнозу, на расстоянии 5.1 сантиморганид. Тип банды конвертированного маркера совпадал с фенотипом растения по проявлению этого заболевания у 23 из 24 сортов. Данный маркер, обозначенный как *AnManM1*, в настоящее время используется в селекционной австралийской программе люпина (Australian national lupin breeding program).

Авторы [3] пришли к заключению, что эффективной стратегией гарантированного широкого использования маркера в селекции люпина является образование на первом эта-

пе многочисленных кандидатов в маркеры, с последующим тестированием их на широком круге сортов с целью выбора лучшего кандидата для конвертирования его в пригодную для использования в селекции форму.

При составлении генетических карт, создании молекулярных маркеров и проведении других исследований у растений широко применяется молекулярная методика AFLP (amplified fragment length polymorphism) [13-15]. Группа молекулярных маркеров AFLP, ISSR, RAPD была использована для оценки генетического разнообразия среди видов люпина *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. cosentinii*, *L. hispanicus*, *L. luteus*, *L. mutabilis*, *L. polyphyllus* [16]. Неожиданно для исследователей были обнаружены низкие уровни генетического сходства между сравниваемыми видами (варьирование составило от 0.205 до 0.432) независимо от типа используемой молекулярной методики, но виды люпина Старого Света четко отличались от видов Нового Света. В то же время результаты молекулярного анализа (AFLP, ISSR) показали в целом высокий уровень генетического разнообразия среди образцов вида *L. angustifolius* [17]. Однако генетическая основа, как отмечают авторы, современных сортов люпина и селекционных линий достаточно узкая, что не так очевидно при анализе морфологических признаков. Существующее расхождение между результатами молекулярных и морфологических анализов приводит авторов к гипотезе, что значительная доля геномов *L. angustifolius* может быть представлена некодирующими районами, в то время как морфологические различия могут быть обусловлены незначительными молекулярными изменениями. В данной работе подчеркивается необходимость сохранения генофонда дикорастущих растений люпина, среди которых можно найти более высокий уровень генетического разнообразия, которое можно использовать в селекционных программах по улучшению культуры люпина. А это очень важно, так как по-прежнему задачи современных селекционных программ люпина заключаются в повышении урожайности, содержания белка, улучшении экологической адаптации, повышении устойчивости к болезням и вредителям, в особенности, к такой болезни как антракноз, которая, является в настоящее время наиболее

распространенной и вредоносной [18].

Как уже было показано выше, у люпина с помощью методики MFLP (microsatellite-anchored fragment length polymorphism) были получены сиквенс-специфические ПЦР маркеры, пригодные для использования в практической селекции люпина [3, 19, 20]. Авторы считают, что данная молекулярная методика является ценной как для проведения фингерпринтинга, так и для создания сиквенс-специфических ПЦР маркеров, используемых в селекции. Так, посредством методики MFLP были получены молекулярные кодоминантные сиквенс-специфические ПЦР маркеры, сцепленные с геном *Phr1*, контролирующим устойчивость к *Diaporthe toxica* у узколистного люпина *L. angustifolius*. Подчеркивается, что маркеры, сцепленные с геном *Phr1*, пригодны для использования в селекционных программах [20].

С помощью методики MFLP были также получены [21] два доминантных сиквенс-специфических ПЦР-маркера, сцепленные с геном *le*, уменьшающим растрескивание бобов у узколистного люпина (*L. angustifolius*). Дело в том, что у диких видов люпина бобы при созревании растрескиваются, что приводит к существенным потерям урожайности. У культурных сортов узколистного люпина этот негативный признак был устранен путем селекционных манипуляций, а именно, включением в геном двух рецессивных генов *ta* и *le*. Например, доместикация узколистного люпина *L. angustifolius* в Западной Австралии начата в 1960 году после обнаружения двух естественных мутантных (рецессивных) генов *tardus (ta)* и *lentus (le)*, обуславливающих нерастрескиваемость бобов. Большое значение имело также открытие в 1961 году гена, нейтрализующего потребность в яровизации и стимулирующего раннее цветение растений люпина [22]. Было установлено, что рецессивные гены *ta* и *le* являются комплементарными и обуславливают почти полную нерастрескиваемость бобов люпина благодаря благоприятным изменениям анатомического строения боба. Первый австралийский сорт, несущий оба таких рецессивных гена, Uni-harvest был районирован в 1971 году, а в 1973 году - сорт Fest, обладающий этими же генами. В последующие годы все австралийские и многие европейские сорта люпина уже содержали оба гена *ta* и *le*. В работе [21] установлено, что один из полученных мар-

керов, сцепленный с геном *le*, *Le M1*, расположен на расстоянии 2.6 сМ (сантиморганид), а другой, *Le M2*, на расстоянии 1.3 сМ от изучаемого гена (*le*). Оба маркера расположены на одном и том же плече хромосомы. Корреляция между генотипом маркера и фенотипом растения по гену *le* составила 95% для австралийских сортов и примерно 36% для изученных диких форм. Эти маркеры могут быть использованы как критерии отбора растений с геном *le* в селекционных программах, в которые включаются интрогрессии от диких форм [21]. Отбор растений люпина с геном *le* в условиях полевого эксперимента требует сохранения растений F_2 в течение 8 недель с тем, чтобы проявился морфологический признак, связанный с этим геном. Естественно, что эффективнее использовать сцепленный с данным геном молекулярный маркер, позволяющий оценить потомство F_2 уже в первые недели роста растений. При скрининге потомства F_2 от скрещивания дикорастущих с культурными растениями маркеры *Le M1* и *Le M2* позволяют селекционеру удалять примерно 25% ненужных *Le Le* растений, гомозиготных по доминантному аллелю *Le*. Однако, поскольку оба маркера доминантны, они не могут дифференцировать в F_2 гомозиготные растения *le le* и гетерозиготные *Le le*. Следовательно, в этом случае может быть необходим дальнейший отбор генотипа *le le* в последующих поколениях селекционного цикла.

Купцов Н.С. и Такунов И.П. [10] приводят данные гибридологического анализа признака «нерастрескиваемость бобов» люпина, где выявлены моно-, ди-, тригибридные и более сложные типы расщепления по данному признаку. Обобщая свои и данные литературы, авторы приходят к выводу, что у узколистного люпина признак «нерастрескиваемость бобов» контролируется блоком из трех рецессивных генов, и что необходимо провести дальнейший поиск новых неаллельных генов для усиления анализируемого признака в селекционных программах.

В другой работе Voersma J.G. et al. [23] сообщается об использовании MFLP методики при получении кодоминантного сиквенс-специфического ПЦР маркера, тесно сцепленного с доминантным геном *Ku*, контролирующим отсутствие потребности в яровизации. Дело в том, что многие формы дикорастущего люпина узколистного требуют определенного периода яровизации для

стимулирования их цветения. Генетические исследования данных авторов показали, что единственный доминантный ген *Ku*, контролирует начало цветения растений люпина и устраняет их потребность в яровизации. Современные культурные сорта люпина, благодаря наличию доминантного гена раннего цветения *Ku*, не требуют яровизации. Это обстоятельство позволило выращивать культурные сорта люпина, несущие этот ген, на обширных площадях Западной Австралии и Европы [23, 24]. Как отмечают Voersma J.G. et al. [23], генофонд современных сортов люпина имеет узкую генетическую основу. В этой связи представляется перспективным включение в селекционные программы дикорастущих форм *L. angustifolius*, что позволит значительно расширить генетическое разнообразие генофонда и использовать ценные гены этих форм в селекционных программах. Однако при скрещивании культурных сортов с дикорастущими типами растений присутствует опасность потерять ценные гены культурных сортов. В данном случае это касается доминантного гена *Ku*. При полевых испытаниях провести фенотипическое различие между генотипами *KuKu* (гомозиготными) и *Kuku* (гетерозиготными) является трудоемким и сложным процессом. Поэтому создание молекулярного кодоминантного секвенс-специфического ПЦР маркера, сцепленного с геном *Ku*, значительно облегчит работу по отбору генотипов *Ku Ku* с этим хозяйственно важным геном в селекционных программах. Созданный авторами маркер *Ku HMI* [23] дает возможность отбирать гомозиготные доминантные по этому гену генотипы и отличать их от гетерозиготных носителей данного гена. Кодоминантное свойство молекулярного маркера особенно важно при использовании его в качестве критерия отбора в селекционных программах. Предварительные данные авторов показывают, что этот маркер находится на расстоянии 0.5 сантиморганид от анализируемого гена *Ku*. Для более точной оценки генетической дистанции и использования данного молекулярного маркера в селекционных программах люпина необходимы, как считают авторы, дальнейшие исследования с привлечением более обширного селекционного материала. Здесь мы приводим данные анализа [23] только одного гена *Ku*, в связи с проводимыми исследованиями по поиску молекулярного маркера, тесно сцепленного с этим геном. Стоит

обратить внимание на результаты, полученные в исследованиях [25], где показано, что у белого люпина *L. albus* признак «время цветения» контролируется полигенно. Этот результат у *L. albus* представляет собой контраст по отношению к приведенным выше результатам у *L. angustifolius*, где время цветения контролируется одним основным геном *Ku*. В своей работе Н.С. Купцов и И.П. Такунов [10] также показывают, что имеется целая система генов, (обозначенная как *Rvt*) связанная с реакцией растений на яровизацию. Полученные ими результаты приводят к выводу, «что в ближайшем будущем необходимо изучить распределение восьми генотипов системы *Rvt* как среди диких форм по регионам Средиземноморского генцентра люпина, так и среди сортов по отдельным зонам люпиносеющих стран, а также определить их селекционную ценность». Этот путь может оказаться перспективным в улучшении люпина, так как реакция растений на действие яровизирующих температур играет важную роль в их продуктивности и адаптации к условиям произрастания.

Серьезной проблемой в селекции люпина является создание безалкалоидных (или с низкой алкалоидностью) форм и сортов и постоянный контроль проявления этого признака в популяциях культивируемых сортов. В этой связи создание молекулярных маркеров, тесно сцепленных с геном, обуславливающим низкое содержание алкалоидов, имеет огромное практическое значение. Целью работы [26] явилось создание посредством методики MFLP молекулярного маркера, сцепленного с рецессивным геном *rauper*, обуславливающим низкое содержание алкалоида. Предполагалось, что такой маркер окажется надежным критерием при идентификации и отборе генотипов с низким содержанием алкалоидов в селекционной программе белого люпина (*Lupinus albus L.*) Следует отметить, что семена и растения дикорастущего люпина *Lupinus albus L.*, а также традиционные местные сорта этого вида люпина содержат высокий уровень алкалоидов, достигающий в семенах до 1,5-2,0%. Но в процессе доместикиции в начале 20 столетия [27] было обнаружено несколько различных «sweetness» генов, обуславливающих низкое содержание алкалоидов у *Lupinus albus L.* [28]. Три рецессивных гена, *rauper*, *exiguus* и *nutricius*, были идентифицированы

и внедрены в коммерческие сорта люпина. Генетический анализ подтвердил, что эти три гена, контролируемые низкое содержание алкалоидов, наследуются независимо [29]. Химические компоненты алкалоидов, контролируемые каждым из этих трех генов, являются разными; но растения, содержащие ген *rauper*, имеют самое низкое общее содержание алкалоидов [30]. Австралийские селекционеры во всех создаваемых сортах используют только один из этих генов, «*rauper*», чтобы предотвратить возможное загрязнение повышенным содержанием алкалоидов из-за перекрестного переопыления форм люпина с разными генами, определяющими низкое содержание алкалоидов. Это связано с тем, что комплементарное взаимодействие упомянутых выше генов приводит к восстановлению высокого уровня алкалоидности. Именно поэтому австралийские ученые пришли к соглашению использовать в селекции белого люпина единственный ген *rauper*. При обсуждении результатов этого исследования мы будем использовать английское слово *sweet* для обозначения низкого содержания алкалоидов и *bitter*- высокого их содержания. Большинство современных сортов *Lupinus albus L.* являются безалкалоидными (*sweet*), они могут служить фуражом для животных и использоваться как продукты питания для человека без риска отравления алкалоидами. При некоторых обстоятельствах выращиваются и сорта с некоторым содержанием алкалоидов, но при этом перед употреблением семян должна производиться соответствующая обработка их для снижения вредного эффекта алкалоидов. Безалкалоидные типы белого люпина в настоящее время выращиваются в Европе, в странах бывшего Советского Союза, Южной Африке, и Северной и Южной Америке. Однако не все селекционеры в этих странах используют один и тот же ген при селекции на низкое содержание алкалоидов. Безалкалоидный белый люпин был введен в Австралии в 1970-х гг. и сейчас выращивается на песчаных почвах в Западной Австралии, и на более плодородных глинистых почвах в Новом Южном Уэльсе Австралии [26].

Хотя белый люпин является преимущественно самоопыляющимся видом, но перекрестное опыление в 5 - 10 %, осуществляемое насекомыми, является достаточным для риска

загрязнения при условии, что по соседству выращивается люпин с другим геном низкой алкалоидности. Благодаря комплементарному взаимодействию рецессивных генов, как было отмечено, если два растения с различными генами низкой алкалоидности скрестить, то в результате F_1 будет высокоалкалоидным, т.е. восстанавливается высокая алкалоидность. Как уже подчеркивалось, чтобы избежать проблемы такого рода загрязнения у белого люпина, австралийские селекционеры пришли к соглашению, что все коммерческие сорта, районированные в этой стране, должны содержать только один рецессивный ген *rauper*, контролирующий низкую алкалоидность [26].

Современная селекция белого люпина имеет относительно короткую историю развития. В этой связи генофонд белого люпина, включающий только ген *rauper*, ограничен. Поэтому для расширения его генофонда селекционерам приходится использовать в селекционной программе местные сорта, дикорастущие формы с высоким содержанием алкалоидов, а также культурные линии этого люпина с другими, нежели *rauper*, генами низкого содержания алкалоидов. При использовании такого разнообразия форм в скрещиваниях возникает проблема корректной идентификации и отбора желательных генотипов с низкой алкалоидностью в создаваемых гибридных популяциях. Традиционно для этих целей широко применяется метод Dragendorff, водный раствор йода и ультрафиолетовое облучение семян (UV) с длиной волны 365 nm. Последний метод является быстрым и надежным для оценки количества алкалоидных семян. Однако с помощью этой методики нельзя из массы семян выделить гетерозиготные, которые, имеется такая опасность, затем будут образовывать алкалоидные растения. Следует отметить, что газовая хроматография способна точно определить количественное содержание алкалоидов. Однако, в настоящее время перед селекционерами люпина стоит проблема, как проводить отбор генотипов из гибридного потомства, содержащих исключительно ген *rauper*, поскольку ни один из простых, быстрых и недорогих тестов (Dragendorff, раствор йода или UV) не способен дифференцировать и исключить растения с низким содержанием алкалоидов, у которых это свойство определяется разными генами, или растения, у которых присутствует более, чем один

ген этого типа. Поэтому возникла необходимость в молекулярном маркере, тесно сцепленном с геном *pauper*, и который был бы низко затратным для использования в практической селекции. Кроме того, статус молекулярного маркера должен быть подтвержден на большом количестве образцов [2]. Такой маркер должен быть пригодным для применения к широкому кругу гибридов в селекционной программе [3]. При выполнении исследований по созданию такого маркера на первом этапе было проведено скрещивание мутанта Киев (содержащего ген *pauper*) и местного эфиопского сорта люпина P27174 с высоким содержанием алкалоидов [26]. Затем популяция рекомбинантных инбредных линий (РИЛ), производных из этого гибрида, была продвинута до F₈. Было прове-

дено также фенотипирование генотипов по содержанию алкалоидов у расщепляющейся популяции. Тест Dragendorff показал, что семена местного эфиопского сорта P27 174 и гибридов F₁ были высоко алкалоидными (*bitter*), в то время как семена родительской формы, Мутанта Киев, были низко алкалоидными (*sweet*). Из всех 190 рекомбинантных инбредных линий F₈ (РИЛ), производных от гибрида Мутант Киев x P27 174, 96 линий были идентифицированы как *bitter*, в то время как у остальных 94 линий семена были *sweet*. Расщепление *bitter*: *sweet* у поколения F₂ соответствовало ожидаемому отношению 1:1, и подтверждало, что признак *sweet* контролируется единственным рецессивным геном, который соответствовал первоначальному описанию гена *pauper* [31].

Таблица 1

Подтверждение сиквенс-специфического ПЦР маркера *Pauper M1* на сортах белого люпина (*Lupinus albus L.*), представляющих различные алкалоидные генотипы (цитируется по [26])

Линии	Происхождение	Алкалоидный генотип	Показание маркера <i>Pauper M1</i> ^a
Мутант Киев	Украина	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Kraffquell	Германия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Pflugs Gela	Германия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Ultra	Германия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Astra	Чили	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Neuland	Германия	Sweet, <i>exiguus</i>	<i>Pauper M1</i> ^B
Start	Россия	Sweet, <i>exiguus</i>	<i>Pauper M1</i> ^B
Nahrquell	Германия	Sweet, <i>nutricius</i>	<i>Pauper M1</i> ^B
P27174 ^b	Эфиопия	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
P24731	Греция	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
P25769	Греция	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^{S, c}
P25785	Греция	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
P25787	Греция	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^{S, c}
P27499	Португалия	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
P27556	Португалия	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
P27670	Турция	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
P27714	Египет	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
P28551	Эфиопия	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
P25758	Греция	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
P26730	Австралия	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
P27641	Франция	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B

^a *Pauper M1*^B = банд маркерного аллеля *bitter*; *bitter* – высокое содержание алкалоидов

Pauper M1^S = банд маркерного аллеля *sweet*; *sweet* – низкое содержание алкалоидов

^b Р число – номер образца коллекции люпина Перт (Perth) генофонда

^c Два генотипа дикорастущих растений из Греции, которые показали слабое сцепление ген – маркер

В качестве материала при поиске кандидата в маркеры, сцепленного с геном *pauper*, были использованы 24 растения, включающие Мутант Киев с низким содержанием алкалоидов (ген *pauper*), эфиопский сорт P27174 (с высоким содержанием алкалоидов), 11 sweet F₈ РИЛ и 11 bitter F8 РИЛ. В конечном итоге был обнаружен доминантный полиморфизм. Затем выбранный маркер MFLP был конвертирован в кодоминантный, секвенс-специфический простой ПЦР маркер.

Путем анализа сцепления с помощью компьютерной программы MapManager маркерных данных и фенотипических данных по проявлению алкалоидов на основе расщепляющейся популяции, содержащей 190 F₈ РИЛ, было установлено, что маркер сцеплен с геном *pauper* на расстоянии 1.4 сантиморганид.

1. Подтверждение статуса маркера

При тестировании маркера *PauperM1* на восьми sweet сортах *L. albus*, пять сортов, содержащих ген *pauper*, показали гомозиготный маркерный банд *PauperM1^S*. Три сорта, содержащих другие рецессивные гены *sweet*, *exiguus* и *nutricius*, показали гомозиготный маркерный банд *PauperM1^B* (табл. 1). Среди 13 bitter образцов, две линии, P25769 и P25787 (Греция), проявили гомозиготный банд *PauperM1^S*. Остальные 11 bitter образцов показали аллельный гомозиготный маркерный банд *PauperM1^B* (табл. 1).

Среди испытанного селекционного материала Австралийской селекционной программы NSW DPI (New South Wales Department of Primary Industries), все 154 sweet линии, обладающие геном низкой алкалоидности *pauper*, показали маркерный банд *PauperM1^S* (данные не представлены).

В таблице 2 представлены результаты подтверждения секвенс-специфического ПЦР маркера *Pauper M1* на местных, зарубежных сортах и селекционных линиях, включенных в Австралийскую селекционную программу белого люпина *Lupinus albus L.*, 24 bitter генотипа показали гомозиготный аллельный банд *PauperM1^B*. Из семи «non-*pauper*» sweet генотипов, шесть показали банд *PauperM1^B*, а один сорт Dietta показал маркерный банд *PauperM1^S*.

Таким образом, успешно созданный маркер *PauperM1* явился эффективным средством для идентификации и отбора желательных генотипов в селекционной программе белого люпина. Появилась возможность отбирать растения, обладающие геном *pauper*, обуславливающим низкое содержание алкалоидов у *L. albus*. Этот маркер способен отличать растения с геном *pauper* от растений, содержащих другие гены, *exiguus* и *nutricius*, также определяющие низкую алкалоидность. Это дает возможность селекционеру проводить отбор нужных генотипов с геном *pauper*. Маркер *PauperM1* тесно сцеплен с самим геном *pauper*, он находится на расстоянии 1,4 сантиморганид от анализируемого гена. Это обеспечивает высокую точность отбора генотипов с геном *pauper* в селекционной программе. *PauperM1* обладает всеми признаками необходимыми для простого, основанного на ПЦР, надежного, недорогого маркера, пригодного для широкого использования в селекционной программе [2, 7].

Таким образом, полученный маркер *PauperM1* показал тип банд, который проявился во всех 154 испытанных сортах и селекционных линиях, содержащих ген *pauper*. Этот тип банд подтверждается как корректно связанный с генотипом на 35 из 37 испытанных алкалоидных образцах (bitter) и на 10 из 11 образцах (sweet) с низкой алкалоидностью, но не содержащих гена *pauper*. Данные результаты указывают на то, что маркер *PauperM1* применим для тестирования широкого круга гибридов в селекционной программе белого люпина *Lupinus albus L.* Так как этот маркер кодоминантный, он способен отличать гомозиготные растения от гетерозиготных в F₂, что неосуществимо при использовании обычных методов (Dragendorff, раствор иода или UV). Данные таблицы 2 показывают, что среди 37 испытанных алкалоидных образцов *Lupinus albus L.* два из них обнаружили банд маркерного аллеля *PauperM1^S*. Из 11 sweet образцов, не имеющих гена *pauper*, один сорт Dietta показал маркерный банд *PauperM1^S* [26]. Появление такого «ложного позитива» обусловлено генетической рекомбинацией, вероятно, возникшей в течение селекционного процесса, на хромосоме в районе между маркером и целевым геном [3].

Таблица 2

Подтверждение сиквенс-специфического ПЦР маркера *Pauper M1* на местных и зарубежных сортах и селекционных линиях, включенных в Австралийскую селекционную программу белого люпина *Lupinus albus L.* (цитируется по [26])

Линии	Происхождение	Алкалоидный генотип	Показание маркера <i>Pauper M1</i>
Andromeda	Австралийский сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Luxor	Австралийский сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Magna	Австралийский сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Minibean	Австралийский сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Rosetta	Австралийский сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Ultra	Австралийский сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
WALAB2008	Австралийский сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Hamburg	Зарубежный сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Ida	Зарубежный сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Madeira	Зарубежный сорт	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
Minori	Зарубежный сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Туптоп	Зарубежный сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Vladimir	Зарубежный сорт	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
98B001-5-5	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
CH306-S	Селекционная линия	Bitter	<i>Pauper M1</i> ^B
Esta-1-15	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
FP21	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Lublanc-1	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Lutop-1	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Multolupa-2	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
W77	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
WK302	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
WK326	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
WTD180-1	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
LAB50001216	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
LAB50001231	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
LAB50001348	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
LAB50001362	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
LAB50001429	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
LAB500011443	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
LAB50001611	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
LAB50001687	Селекционная линия	Sweet, <i>pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Tuman	Зарубежный сорт	Sweet, <i>non-pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^B
Dietta	Зарубежный сорт	Sweet, <i>non-pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^S
Libed	Зарубежный сорт	Sweet, <i>non-pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^B
Veresnevny	Зарубежный сорт	Sweet, <i>non-pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^B
L80/91	Селекционная линия	Sweet, <i>non-pauper</i>	<i>Pauper M1</i> ^B

Pauper M1^B = банд маркерного аллеля bitter; bitter – высокое содержание алкалоидов

Pauper M1^S = банд маркерного аллеля sweet; sweet – низкое содержание алкалоидов

В случае, если обнаружены линии с «ложным позитивом» молекулярного банды, рекомендуется не включать этот генофонд в селекционную программу, но маркер, показавший положительные результаты на многочисленных образцах, сохранить для широкого использования. Но, если данный генофонд

представляет ценность, то следует начать поиск нового маркера, теснее сцепленного с целевым геном, для того, чтобы снизить риск генетических рекомбинаций.

Таким образом, созданный молекулярный маркер, обозначенный как *PauperM1*, способен отличать ген «раувер» от двух других генов, обуславливающих низкое содержание

алкалоидов, «exiguus» и «nutricius». Подтверждение этого маркера на генофонде, включенном в Австралийскую селекционную программу люпина, показало, что образец банды маркера *PauperM1* соответствует генотипам по содержанию алкалоидов у широкого круга культурных сортов и селекционных линий (т.е. банд маркера точно указывает на присутствие гена «rauper»). Сейчас молекулярный маркер *PauperM1* включается в Австралийскую программу селекции белого люпина *Lupinus albus L.* в качестве критерия отбора (MAS).

2. Создание генетических карт у люпина

Первая попытка создания генетической карты с использованием молекулярных методик у люпина узколистного была предпринята в Польше [32, 33]. Однако, как отмечают Voersma et al. [34] до недавнего времени не было опубликовано ни одной, полной генетической карты. Первая, хотя и не совсем полная, по признанию самих авторов, генетическая карта люпина опубликована Voersma et al. [34]. С помощью молекулярной методики MFLP было создано 522 уникальных маркера у люпина узколистного, из которых 21% составили кодоминантные маркеры. 454 маркера (87%) объединены в 21 группу сцепления. Общая длина генетической карты составила 1543 сантиморганиды, средняя дистанция между близлежащими маркерами - 3.4 сантиморганиды. В данной работе идентифицированы молекулярные маркеры, сцепленные с ценными генами, определяющими многие важные признаки культурного люпина (*L. angustifolius*), в том числе гены устойчивости к антракнозу. У белого люпина (*Lupinus albus L.*) первая генетическая сравнительная карта сцепления была также опубликована австралийскими исследователями [25]. Эта карта включала 28 основных групп сцепления (LG), варьировавших по длине (от 22,7 до 24,5 сантиморганид). Общая длина карты составила 2951 сантиморганиду. Этими авторами были также идентифицированы локусы (QTLs), контролирующие признаки, такие как устойчивость к антракнозу, время цветения растений и содержание алкалоидов. Два локуса QTLs со значительными эффектами на устойчивость к антракнозу идентифицированы в группе сцепления LG 4 и группе LG 17, и два локуса QTLs, влияющие на время цветения, опреде-

лены в группах сцепления LG 1 и LG 3. Единственный локус, контролирующий содержание алкалоидов, картирован в группе сцепления LG 11. В этом случае отношение: высокое - и низкое содержание алкалоидов было 1:1, что дает основание предположить, что только один ген контролирует этот признак. Показано, что содержание алкалоидов у *L. angustifolius* также контролируется единственным локусом [35].

В рассматриваемой работе [25] оценена степень консервативной синтении (synteny) между *Lupinus albus L.* и модельным объектом бобовых растений *Medicago truncatula*. Для того чтобы оценить уровень синтении между *Lupinus albus L.* и *M. truncatula* генетическая карта *L. albus* сравнивалась с наиболее современной версией физической карты *M. truncatula*. Для установления синтенических взаимоотношений (сходства групп сцепления у организмов, относящихся к разным таксонам) между двумя таксонами было выбрано 45 ортологичных маркеров (ортологичный маркер - это маркер, детерминирующий один и тот же признак и произошедший от одного предкового гена), и они были картированы у *Medicago truncatula* и *Lupinus albus*. С их помощью идентифицированы 17 небольших синтенических блоков, состоящих из двух и более маркеров, в 17 отдельных группах сцепления. При этом каждая из 8 хромосом *M. truncatula* показала соответствующие синтенические районы у хромосом *L. albus*. Анализ показал, что синтенические взаимоотношения между этими таксонами были сложными, имелись многочисленные прерывания синтении между двумя сравниваемыми геномами. Это можно объяснить тем, что между сравниваемыми таксонами существует значительная эволюционная дистанция. Кроме того, они различаются хромосомными числами ($n=8$ у *M. truncatula* и $n=25$ у *L. albus*). Макросинтения, ограниченная только небольшим геномным интервалом, была обнаружена и у *L. angustifolius* и *M. Truncatula* [35]. Можно ожидать, что успех в применении макро - и микросинтении поможет идентифицировать тесно сцепленные маркеры, а также изолировать важнейшие гены. Хотя генетическая сравнительная карта *L. albus* включает более 300 маркеров, но этого числа недостаточно, как считают Phan et al. [25] для того, чтобы провести детальное сравнение геномов *L. albus* и *L. angustifolius*. Сравнение таким спо-

собом генетических карт разных видов растений может оказаться наиболее подходящим методом исследования эволюции трибы *Genistae*.

Предпринята попытка физического картирования геномов рода *Lupinus*. Так, В. Naganowska и А. Zielinska [36] использовали методику FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) для изучения распределения генов рибосомной ДНК (18S рДНК – 25S рДНК и 5S рДНК) в геноме с целью физического их картирования у пяти видов люпина: *L. consentinii* (2n=32), *L. pilosus* (2n=42), *L. angustifolius* (2n=40), *L. luteus* (2n=52) и *L. mutabilis* (2n=48). Данные гены ДНК (18S рДНК – 25S рДНК и 5S рДНК) были использованы в качестве зондов. В результате исследований обнаружено некоторое межвидовое варьирование числа и размеров локусов 18S рДНК – 25S рДНК. Все изученные виды имели одну пару хромосом, несущих 5S рДНК. Хотя род *Lupinus* по происхождению считается полиплоидным, но уровни плоидности неясны до сих пор. Кроме того, виды люпина внутри рода *Lupinus* различаются по числу хромосом. По мнению В. Naganowska и А. Zielinska [36], низкое число локусов обоих типов рДНК, обнаруженное в их исследовании у люпинов, по-видимому, противоречит гипотезе полиплоидного их происхождения. Однако у некоторых родов растений число локусов рДНК отражает процесс полиплоидизации [37]. В то же время другие исследования указывают, что гены рДНК могут и не быть прямыми маркерами полиплоидного происхождения. Возможно, что некоторые локусы рДНК могли потеряться в процессе эволюции [38]. В. Naganowska и А. Zielinska [36] считают, что многочисленные хромосомные перестройки могли возникать на протяжении длительного периода развития люпинов. Это могло привести к созданию современных форм – цитогенетически стабильных, функциональных диплоидов. Проанализированные в их исследовании виды люпинов, принадлежат к трем таксономически различающимся группам, но результаты их исследований по распределению рДНК локусов в геномах не отражает этого деления на группы.

В более поздней работе данных авторов (Naganowska, Zielinska, [39] представлены результаты изучения специфического локуса рДНК генома люпина в процессе прохождения клеточного цикла с применением методики FISH. В исследовании включено 12 видов люпина, принадлежащих к двум различным группам: 1) *Scabrisper-*

mae (шереховатосемянные) – *L. atlanticus* Gladst. (2n=36), *L. consentinii* Guss. (2n= 32), *L. digitatus* Forsk. (2n=36), *L. palaestinus* Boiss. (2n=42), *L. pilosus* Murr. (2n=42), *L. princei* Harms (2n=38); 2) *Malacospermae* (гладкосемянные)- *L. anatolicus* (2n=42), *L. micranthus* Guss. (2n=52), *L. albus* (2n=50), *L. hispanicus* ssp. *hispanicus* Boiss., Reut. (2n=52), *L. luteus* L. cv Ventus (2n=52), *L. angustifolius* L. cv Sonet (2n=40). В результате данного исследования были обнаружены 4 слабых сигнала в сайте 18S рДНК-25S рДНК в интерфазе клеточного цикла вместо 2 сильных сигналов, проявляющихся на стадии метафазных хромосомах. Исследование всего клеточного цикла показало, что эти различия в числе и интенсивности сигналов обусловлены деконденсацией вторичной перетяжки внутри локуса 18S-25S рДНК на паре сателлитных хромосом. Результаты данного исследования также показали, что число и относительная локализация рДНК сайтов в интерфазном ядре необязательно соответствуют взаимоотношениям этих показателей в метафазе. По мнению В. Naganowska и А. Zielinska [39], это следует учитывать в исследованиях других родов растений.

В работе I. Haidera et al. [40] проведен молекулярно-цитогенетический анализ двух видов люпина, *L. angustifolius* и *L. consentinii*, с использованием проточной цитометрии (flow cytometry) и метода FISH, а также с применением различных методик окрашивания хромосом. Были определены примерные размеры геномов (2.07 пкг-у *L. angustifolius* и 1.54 пкг – у *L. consentinii*). Эти показатели геномов коррелировали с хромосомными числами этих видов (2n=40 у *L. angustifolius* и 2n= 32 у *L. consentinii*). Анализ количества ядерной ДНК в клетках растений в процессе развития выявил эндополиплоидию в различных органах, наиболее высокий ее уровень наблюдался в котилонах (32 C - у *L. angustifolius* и 64 C - у *L. consentinii*). Оба исследованных вида люпина принадлежат к полисоматическому типу развития. Одновременное использование метода FISH и зондов 5S и 25S рДНК позволило идентифицировать 25% хромосом генома у исследованных видов (10 из 40 хромосом у *L. angustifolius* и 8 из 32 - у *L. consentinii*). Распределение кластера генов рибосомной РНК 5S и 25S различалось между двумя исследованными видами *Lupinus*. Методика FISH, примененная наряду с зондами рДНК к метафазным хромосомам, показала, что два типа генов рРНК

локализованы на разных хромосомах. У *L. angustifolius*, в геноме которого идентифицировано 10 из 40 хромосом, показано, что одна пара хромосом несет кластер генов 25S рРНК, занимающий большую дистальную часть короткого плеча и полностью покрывающий вторичную перетяжку ядрышкообразующего района хромосом (NOR). Все сайты 5S рДНК, варьирующие по размеру, локализованы на коротких плечах четырех пар хромосом и распределены либо в периферической, либо дистальных частях соответствующего плеча хромосомы. Одна пара локусов 5S рДНК была значительно больше, чем все остальные. Результаты, полученные в данном исследовании, несколько противоречат результатам, сообщен-

ным В. Naganowska и А. Zielinska [39], которые обнаружили только самую большую пару 5S рДНК сайтов.

По мнению I. Haidera et al. [40], различия в результатах, полученные разными авторами, по числу рДНК локусов могут быть объяснены внутривидовым варьированием люпинов, а также особенностями применяемых при исследовании методик. FISH анализ генома *L. contentinii* обнаружил присутствие только двух 5S рДНК сайтов и шесть 25S рДНК сайтов, которые маркировали 8 из 32 хромосом этого вида. Как считают данные исследователи, для дальнейшей идентификации хромосом и их кариотипирования необходимы дополнительные маркеры.

Заключение

Огромные инвестиции в мире направлены на исследования, связанные с созданием молекулярных маркеров для широкого использования в селекционных программах (MAS - Marker-Assisted Selection) многих сельскохозяйственных культур, в частности, люпина. Сведения, имеющиеся к настоящему времени о создании молекулярных маркеров, тесно сцепленных с генами, обуславливающими хозяйственно ценные признаки люпина, и их широкое применение в австралийских программах селекции для идентификации и отбора желательных генотипов, подтверждают их большое значение для повышения эффективности селекционного процесса. У люпина такого рода работы наиболее интенсивно проводятся в Австралии: некоторые созданные маркеры используются в качестве критериев отбора в австралийской национальной программе селекции люпина (Australian national lupin breeding program). При создании сиквенс-специфических ПЦР маркеров широко используется молекулярная методика MFLP (Microsatellite-anchored Fragment Length Polimorphism).

В литературе сообщается о получении молекулярных маркеров, сцепленных с генами, определяющими многие хозяйственно ценные признаки у люпина. Например, к таким молекулярным маркерам относятся: *Antj M2*, сцепленный с доминантным геном устойчивости люпина к антракнозу «*Lanr1*»; два доминантные сиквенс-специфические ПЦР маркеры, *Le M1* и *Le M2*, сцепленные с геном *le*, уменьшающим растрескивание бобов у узколистного люпи-

на (*L. Angustifolius*); кодоминантный сиквенс-специфический ПЦР маркер *Ku HMI*, сцепленный с доминантным геном *Ku*, контролирующим отсутствие потребности в яровизации; маркер *PauperM1*, сцепленный с рецессивным геном *pauper*, обуславливающим низкое содержание алкалоида в семенах белого люпина (*Lupinus albus L.*). Эти маркеры могут быть использованы и некоторые из них используются как надежные критерии идентификации и отбора желательных генотипов из гибридных популяций в селекционных программах.

Одно из препятствий на пути создания эффективного молекулярного маркера заключается в том, что он не является частью самого критического гена, а может быть локализован на некоторой, иногда значительной, генетической дистанции, от целевого гена, что создает условия для рекомбинации между маркером и геном. Это может приводить к возникновению «ложных позитивов» при тестировании маркера на большом числе образцов. В результате сорта, показывающие желательные маркеры, не обязательно обладают интересующим селекционера геном, и наоборот.

Ученые пришли к убеждению, что эффективной стратегией гарантированного широкого использования маркера в селекции люпина является образование на первом этапе многочисленных кандидатов в маркеры, с последующим тестированием их на широком круге сортов с целью выбора лучшего кандидата для конвертирования его в пригодную для исполь-

зования в селекции форму.

Молекулярные методики широко применяются при конструировании генетических карт, а также исследовании геномов люпина. Первая опубликованная, сравнительно полная, карта *L. angustifolius L.* создана в Австралии. Австралийскими исследователями создана и первая генетическая сравнительная карта сцепления у белого люпина (*Lupinus albus L.*).

На основе анализа указанных источников можно заключить, что прогресс в повышении эффективности селекционных программ люпи-

на так же, как и других сельскохозяйственных культур, в значительной степени зависит от совершенствования и применения современных молекулярных технологий и правильного сочетания их с традиционными методами.

Идентификация посредством молекулярных методик, локусов (QTLs), контролирующих количественные признаки, и использование результатов в генетических исследованиях и практической селекции помогут применить новые подходы в решении некоторых вопросов количественной генетики.

Список использованных источников

1. Koebner, R. The impact of molecular markers on the wheat breeding paradigm/ R. Koebner, R. Summers // Cell Mol. Biol. Letter. – 2002. – V.7. – P. 695–702.
2. Molecular markers and their applications in wheat breeding / P.K. Gupta [et al.] // Plant Breeding. – 1999. – V. 118. – P. 369–390.
3. A strategy to develop molecular markers applicable to wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupin (*L. angustifolius L.*) / H. Yang [et al.] // Mol. Breeding – 2008. – V. 21. P. 473 – 483.
4. Holland, J.B. Implementation of molecular markers for quantitative traits in breeding programs—challenges and opportunities // Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, 26 Sep–1 Oct 2004. Brisbane, Australia (<http://www.cropscience.org.au>).
5. PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding/ M. You [et al.] // Cell Mol. Biol. Lett. – 2005 – V.10. – P. 123 – 134.
6. Validation of molecular markers for wheat breeding/ P.J. Sharp [et al.] // Aust. J. Agric Res. – 2001. – V. 52. – P.1 357 – 1366.
7. Implementation of markers in Australian wheat breeding/ H.A. Eagles [et al.] // Aust. J. Agric. Res. – 2001. – V. 52. – P. 1349 – 1356.
8. Diagnostic DNA markers for cereal cyst nematode resistance in bread wheat / F.C. Ogbonnaya [et al.] // Aust. J. Agric. Res. 2001. – V. 52. P. 1367 – 1374.
9. Snape, J.W. Challenges of integrating conventional breeding and biotechnology: a personal view/ Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, 26 Sep–1 Oct 2004. Brisbane, Australia (<http://www.cropscience.org.au>).
10. Купцов Н.С. Люпин. Генетика, селекция, гетерогенные посевы/ Н.С.Купцов, И. П. Такунов. Брянск. – 2006. – 575 с.
11. Development and implementation of a sequence-specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius L.*) / H. Yang [et al.] // Mol. Breed. – 2004. – V. 14. – P. 145 – 151.
12. Lupin / Clements J.C [et al.] // Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement / R.J. Singh, P.P. Jauhar (eds). CRC Press. USA. – 2005. – P. 231–323.
13. Eyjayl, I. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat / I. Eyjayl [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2002 – V. 104 – P. 399–407.
14. Construction of a genetic map for *Arabica coffee* / H. Pearl [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2004. – V. 108. – P. 829 – 835.
15. Nearly complete genetic maps of *Pinus sylvestris L.* (Scots pine) constructed by AFLP marker analysis in full-sib family/ T.M. Yin [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2003. – V. 106. – P. 1075 – 1083.
16. AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp./ Talhinhos, P. [et al.] // Plant Breed. – 2003 – V. 122 – P. 507–510.
17. Talhinhos, P. Collection of *Lupinus angustifolius L.* germplasm and characterization of morphological and molecular diversity / P. Talhinhos, I. Leitao, I Neves–Marting // Genetic resources and Crop Evolution – 2006 – V. 53 – P. 563–578.
18. Yang, H. The taxonomy of *Colletotrichum* isolates associated with lupin anthracnose/ H. Yang, M.W Sweetingham // Aust. J. Agric.

Res. – 1998 – V.49 – P.1213–1223.

19. Yang, H. DNA fingerprinting based on micro-satellite anchored fragment length polymorphisms, and isolation of sequence-specific PCR markers in lupin (*Lupinus angustifolius L.*) / H. Yang [et al.] // Mol. Breed. – 2001 – V. 7 – P. 203–209.

20. Development of molecular markers using MFLP linked to a gene conferring resistance to Diaporthe toxica in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius L.*) / H. Yang [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2002 – V. 105 – P. 265–270.

21. Development of two of a sequence-specific PCR marker linked to the *le* gene that reduces pod shattering in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius L.*) / J.G. Boersma [et al.] // Genet and Mol Biol. – 2007 – V. 30, – P. 3, 623–629.

22. Gladstones, J.S. Selection for economic characters in *Lupinus angustifolius* and *L. digitatus*. 1. Non-shattering pods. / J.S. Gladstones // Aust. J. Exp. Agric. and Anim. Husb. 1967. – V. 7. – P. 360–366.

23. Development of a sequence-specific PCR marker linked to the *Ku* gene which removes the vernalisation requirement in narrow-leafed lupin / J.G. Boersma [et al.] // Plant Breeding – 2007 – V. 126 – P. 306–309.

24. Gladstones, J.S. Selection for economic characters in *Lupinus angustifolius* and *L. digitatus*. 2. Time of flowering / J.S. Gladstones, G.D. Hill // Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. – 1969 – V. 9 – P. 213–220.

25. The first genetic and comparative map of white lupin (*Lupinus albus L.*): Identification of QTLs for anthracnose resistance and flowering time, and Locus for alkaloid content / H.T.T. Phan [et al.] // DNA research. – 2007 – P. 1–12.

26. Development of a sequence-specific PCR marker linked to the gene «pauper» conferring low-alkaloids in white lupin (*Lupinus albus L.*) for marker assisted selection/ R. Lin [et al.] // Mol. Breeding. – 2009. – V 23 – P. 153 – 161.

27. Hondelmann, J.B. The lupin – ancient and modern crop plant / J.B. Hondelmann // Theor. Appl. Genet. – 1984 – V. 68 – P. 1–9.

28. Kurlovich, B.S. Genetics of lupines. In: Kurlovich B.S. (Ed) Lupinus: geography, classification, genetic resources and breeding. Intan, St. Petersburg, Russia. ISBN 5–86741–034–X – 2002.

29. Harrison, J.E.M. Genetical control of alkaloids in *Lupinus albus*. / J.E.M. Harrison, W. Williams // Euphytica – 1982 – V. 31 – P. 357–364.

30. Harrison, J.E.M. The control of alkaloid by mutant alleles in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* / J.E.M. Harrison, W. Williams // Z.Plazenzuchtg – 1983 – V. 90 – P. 32–41.

31. Gladstones J.S. Lupin as crop plants. Field crop abst. – 1970 – V. 23 – P. 123–148.

32. Wolko, B. Linkage maps of isozyme and RAPD markers for the *Lupinus angustifolius L.* / B. Wolko, N. Weden // Advances in Lupin Research Proc. 7th Int. Lupin Conf. Evora, Portugal, – 1994 – P. 42–49.

33. Kruszka, K. Linkage maps of morphological and molecular markers in lupin. / K. Kruszka, B. Wolko // Proc. 9th Int. Lupin Conf. Klink / Muritz, Germany, – 1999 – P. 100–105.

34. Construction of a genetic linkage map using MFLP, and identification of molecular markers linked to domestication genes in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*) / Boersma J.G. [et al.] // Cell Mol. Biol. Lett. – 2005 – V. 10 – P. 331–344

35. The first gene-based map of *Lupinus angustifolius L.* – location of domestication genes and conserved synteny with *Medicago truncatula* / Nelson M. [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2006. – V. 113 – P. 225–238.

36. Naganowska, B. Physical mapping of 18Sr – 25Sr DNA and 5S rDNA in *Lupinus* via Fluorescent in situ hybridization / B. Naganowska, A. Zielinska // Cell. Mol. Biol. Lett., – 2002 – V. 7 – P. 665–670.

37. Cytological studies of the nucleolus organization regions in the *Medicago* complex: *sativa-coerulea-falcata* / O. Calderini [et al.] // Genome – 1996 – V. 39 – P. 914–920.

38. Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by in situ hybridization / H. Thomas [et al.] // Genome. – 1997 – V. 40 – P. 406–410.

39. Naganowska, B. Localisation of rDNA in the *Lupinus* genome during the cell cycle/ B. Naganowska, A. Zielinska // J. Appl. Genet. – 2004 – V. 45 (2) – P. 189–193.

40. Molecular cytogenetic analysis of genome structure in *Lupinus angustifolius* and *Lupinus cosentinii* / I. Hajdera [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2003 – V. 107 – P. 988–996.

Дата поступления статьи 2 сентября 2010 г.

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

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ В БЕЛОРУССКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ *Puccinia triticina* ERIKSS

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

Введение

В условиях Беларуси одним из вредоносных и распространенных заболеваний пшеницы является бурая ржавчина, вызываемая грибом *Puccinia triticina* Erikss. Бурая ржавчина при сильном поражении посевов может снижать урожай зерна пшеницы от 30% [1] до 70% [2]. Кроме того, ухудшаются технологические качества продукции, полученной из зерна с пораженных растений. Химические средства защиты пшеницы от грибных патогенов являются мало эффективными, так как возбудитель этого заболевания способен давать несколько поколений в течение вегетационного периода растений, распространяться ветром на значительные расстояния и адаптироваться к фунгицидам. Известно также, что темпы роста затрат на химические средства защиты в 4–5 и более раз опережают прирост стоимости дополнительного урожая [3]. В связи с этим наиболее экономически выгодным и экологически чистым средством борьбы с болезнями и вредителями является выведение и возделывание устойчивых сортов.

Изменчивость патогенов при их высоком репродукционном потенциале приводит к потере устойчивости сортов при широком возделывании в среднем в течение 4–5 лет из-за появления и накопления новых вирулентных рас [4]. Поэтому одним из важнейших разделов исследований по генетике фитоиммунитета является анализ популяций возбудителей болезней по генотипическому составу по признаку вирулентности. Это необходимо для прогнозирования появления и накопления генов вирулентности, способных поражать не только уже возделываемые сорта, но и используемые в селекционных программах доноры

устойчивости для своевременной их замены новыми источниками с эффективными генами резистентности.

В 1996–1999 гг. было проведено изучение европейских популяций (Франция, Германия, Словакия, Италия, Испания, Польша, Болгария, Румыния, Чехия) и была показана высокая эффективность генов Lr9 и Lr19 во всей Европе [5]. Изучение популяций *Puccinia triticina*, распространенных на территории Германии и Европейской части России в 2001–2003 гг., показало отсутствие клонов, вирулентных к генам Lr9, Lr19, Lr24, Lr38 [6]. Однако в 2007 году в структуре российской популяции не встречались лишь клоны, поражающие ген Lr9 [7, 8]. Кроме того, отмечается, что распространение в производстве сортов яровой мягкой пшеницы, имеющих ген Lr19, привело к потере эффективности этого гена в Поволжье [7]. По данным других авторов эффективными на территории России в 2006–2008 гг. по-прежнему остаются гены Lr9, Lr24, Lr29, Lr38, Lr41, Lr45, Lr47 [9]. Исследования популяции бурой ржавчины в Чешской республике в 2001–2004 гг. также показали эффективность генов устойчивости Lr9, Lr19 [10]. Однако уже в 2008 году в этой популяции обнаружены клоны вирулентные к гену Lr19 [11]. На территории Украины эффективными к возбудителю бурой ржавчины являются гены Lr9 и Lr19 [12].

Целью данного исследования было изучить и сравнить белорусские популяции бурой ржавчины, распространенные на территориях республики с максимальным разнообразием селекционного и генетического материала мягкой пшеницы.

Материалы и методы

Выделение моноспоровых изолятов бурой ржавчины проводили из гербаризированных листьев озимой и яровой пшеницы, имеющих симптомы поражения бурой ржавчиной, собранных в июне-июле 2009 года на Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси (БОС ИГЦ) и на Экспериментальной базе «Зазерье» (Пуховичский район). Использовали методику сбора Михайловой и Квитко (1970). Образцы хранили в холодильнике при температуре +3-5°C.

Выделение и размножение клонов возбудителя бурой ржавчины для дифференциации популяции гриба осуществляли на восприимчивом сорте Thatcher. Семена высевали в эмалированные кюветы на слой ваты, обильно смоченной водой. От 9-дневных растений отделяли первые листья, разрезали их на отрезки длиной 2 см и плотно раскладывали в кювету размером 18x24 см, погружая одним концом в 0,6% агаризованную среду с добавлением 40 мг бензимидазола на 1 л воды. С гербаризированных листьев, пораженных бурой ржавчиной, снимали уредопустулы скальпелем на часовое стекло. Суспензию готовили из расчета 2-3 споры в поле зрения микроскопа при увеличении 200x в 0,1% водном растворе агар-агара и наносили с помощью пульверизатора на заражаемые растения. Для создания высокой влажности кюветы помещали в полиэтиленовые пакеты, выдерживали сутки на рассеянном свете, а затем переносили в камеру с регулируемым режимом (температура - +20°C, освещенность - 6 тыс. лк, фотопериод - 16 часов).

Спустя 4-5 дней после инокуляции, с момента появления мелких светловатых пятен, листья разрезали на отрезки таким образом, чтобы каждый из них содержал единственное пятно (будущую уредопустулу). Эти отрезки помещали по одному в чашки Петри со скошенным слоем 0,6% агар-агара с добавлением 40 мг бензимидазола на 1 л воды. Когда пустула хорошо развивалась, в чашку Петри добавляли 5 отрезков листьев 3-4 см длиной от незараженных растений пшеницы восприимчивого сорта Thatcher. В день закладки дополнительных листьев осуществ-

ляли их заражение уредоспорами, находящимися на отдельном отрезке листа в той же чашке Петри. Споры наносили препарировальной иглой, а затем зараженные листья обильно увлажняли из пульверизатора дистиллированной водой. Чашки выдерживали сутки на рассеянном свете, а затем помещали в камеру.

Размножали клоны патогена на отрезках листьев сорта Thatcher, которые погружали одним концом в косой слой агар-агар, разлитый в чашки Петри. Отрезки заражали с помощью кисточки, используя споровую суспензию большой концентрации.

Для определения генотипов клонов по генам вирулентности использовали серию изогенных линий, созданную на основе сорта яровой пшеницы Thatcher (Tc) и сорта с генами устойчивости (таблица).

Работу проводили на отрезках листьев по модифицированной методике [13]. Семена изогенных линий высевали в эмалированные кюветы на слой ваты, обильно смоченной водой. От молодых (7-9 дневных) растений каждой изогенной линии отделяли первые листья, разрезали их на отрезки длиной 1,5 см и размещали по кругу группами (по 5 отрезков от 5 растений) в чашках Петри на среду, приготовленную выше описанным способом. Эти отрезки заражали уредоспорами индивидуального клона, выделенного из популяции.

Инокулом готовили следующим образом: споры с отрезков листьев сорта Thatcher соскребали скальпелем на часовое стекло с небольшим количеством дистиллированной воды, тщательно перемешивали и наносили кисточкой на отрезки листьев изогенных линий. Затем их выдерживали сутки на рассеянном свете и помещали в камеру с регулируемым режимом, указанным выше. Спустя 9 дней после инокуляции определяли тип реакции растений по шкале [14]. К устойчивым относили отрезки с 0-2 типом реакции, к восприимчивым - 3,4 типами.

Сравнение частот генов вирулентности в популяциях бурой ржавчины проводили по критерию χ^2 [15] с помощью программы AB-STAT.

Результаты и их обсуждение

Популяция возбудителя бурой ржавчины, собранная на посевах генетических коллекций мягкой пшеницы на БОС ИГЦ (Минский район) в 2009 году, характеризовалась наличием 34 генотипов патогена, которые имели 27-33 аллеля вирулентности. Наибольшее число генотипов имели по 30-31 гену вирулентности. Клоны с 27-28 р-генами встречались редко. Популяция патогена, собранная на селекционных посевах Пуховичского района (Экспериментальная база «Зазерье») в 2009 году, состояла из 53 генотипов по генам вирулентности. Генотипы возбудителя болезни имели от 26 до 34 генов вирулентности. Большинство генотипов обладало 30 и 29 аллелями вирулентности (33,3% и 25,3% клонов соответственно). Генотипы с 31 аллелем вирулентности занимали 17,7%. Редко встречались изоляты паразита с 34 или 26 р-генами. Не обнаружено универсально вирулентных клонов, поражающих все изогенные линии.

При анализе белорусских популяций оказалось, что частоты генов р3с, р10, р11, р12, р13, р14а, р14б, р16, р17, р18, р17, р20, р21, р22а, р22б, р23, р25, р29, р30, р31, р32, р34, рV в популяциях Минского и Пуховичского района одинаковы и составляют 100% (таблица). Таким образом, можно отметить, что эти гены вирулентности являются наиболее распространенными в данных местностях и присутствуют во всех генотипах изученных клонов бурой ржавчины. Следовательно, гены резистентности пшеницы р3с, Lr10, Lr11, Lr13, Lr14а, Lr14б, Lr16, Lr17, Lr18, Lr17, Lr20, Lr21, Lr23, Lr25, Lr29, Lr30, Lr31, Lr32, LrV полностью преодолены паразитом и являются неэффективными, что должно учитываться при выведении сортов, устойчивых к этому патогену. Гены Lr12, Lr22а, Lr22б, Lr34 не эффективны на стадии проростка, так как являются возрастными.

Таблица 1

Частота генов вирулентности в белорусских популяциях возбудителя бурой ржавчины пшеницы в Минском и Пуховичском районах

Ген вирулентности	Изогенная линия (сорт) мягкой пшеницы, содержащий соответствующий ген устойчивости к патогену	Процент вирулентных клонов	
		БОС ИГЦ Минский район	ЭБ «Зазерье» Пуховичский район
p1	Centenario/6*Tc	35,38	41,4
p2a	Webster/6*Tc	81,13**	41,4
p2b	Tc*6/Carina	83,72**	52,72
p2c	Prelude*5/Brevit	88,37*	70,9
p3a	Democrat/6*Tc	55,81**	92,7
p3b	Bage/8*Tc	18,6**	94,5
p3c	Tc*6/Klein Aniversario	100	100
p9	Tc*6/Transfer	2,8	1,1
p10	Exchange/6*Tc	100	100
p11	Tc*6/Hussar	100	100
p12	Exchange/6*Tc	100	100
p13	Manitou (Thatcher type)	100	100
p14a	Selkirk/6*Tc	100	100
p14b	Maria Escobar/6*Tc	100	100
p15	Tc*6/Kenya W 1483	86,32	81,71
p16	Exchange/6*Tc	100	100
p17	Klein Lucero/6*Tc	100	100
p17b	Harrier	97,6**	63,6
p18	Africa 43/7*Tc	100	100
p19	Agatha	2,4	1,1
p20	Tc*6/Timmo	100	100
p21	Canthatch (K-44431)	100	100
p22a	Tc*7//Tetra Canthatch/RL5271	100	100

Продолжение таблицы

p22b	Thatcher (Tc)	100	100
p23	Lee FL 310/6*Tc	100	100
p24	Agent	47,05	54,77
p25	Tc*7/Transec	100	100
p26	Кавказ	3,3**	20,96
p29	Thatcher*6//CS 7D/Ag#11	100	100
p30	Tc*6/Terenzio	100	100
p31	Gatcher (+Lr27)	100	92,7
p32	Th*6/PI 58548	100	100
p33	Tc*6/PI 58548	100	100
p34	Th/6*Terenzio	100	100
p39	KS 86 WGRC 02	87,73	82,26
p42	KS91WGRC11	25,47*	15,59
pB	Tc/6*Carina	100	100

Примечание

Различия между частотой идентичных генов вирулентности достоверны *– при $P < 0,05$, ** – при $P < 0,01$.

Для выяснения их эффективности необходима оценка растений на поздних этапах онтогенеза.

Встречаемость генов вирулентности p15 и p39 в Минском районе практически не отличается от таковой в Пуховичском и составляет высокий процент, что также определяет гены резистентности пшеницы Lr15 и Lr39 к возбудителю бурой ржавчины как малоэффективные и их использование не рекомендуется.

Гены Lr24 и Lr1 обеспечивают резистентность соответственно к 53% и 65% клонов возбудителя бурой ржавчины в Минском районе и 45% и 59% в Пуховичском, что характеризует эти гены как более эффективные, по сравнению с вышеописанными, однако не позволяет рекомендовать их для использования в селекции.

Процент клонов, несущих гены вирулентности p2a, p2b, p2c, p17b, в Минском и Пуховичском районе различается. В Минской популяции эти гены резистентности обеспечивают устойчивость не более, чем к 19% изолятов возбудителя бурой ржавчины, в то время как в Пуховичской популяции гриба этот процент достоверно повышается до 59%. Это позволяет сделать вывод о более высокой эффективности указанных генов в Пуховичском районе, что, по-видимому, связано с малой распространенностью в этой области сортов с комплементарными к ним генами устойчивости. Однако, гены устойчивости Lr2a, Lr2b, Lr2c и Lr17b также нельзя считать высокоэффективным для использования в обеих зонах, так как частота встре-

чаемости клонов с преодолевающими их генами вирулентности достаточно высока.

Частота встречаемости генов вирулентности p3a и 3b, обнаруженных в популяциях гриба в Минском и Пуховичском районах, различается. В пуховичской популяции комплементарные этим р-генам гены резистентности обеспечивают устойчивость не более, чем к 7% изолятов возбудителя бурой ржавчины, в то время как в Минском районе этот процент достоверно повышается до 81%. Это позволяет сделать вывод о более высокой эффективности рассматриваемых генов в Минском районе. По-видимому, данное явление связано с использованием в селекционном процессе указанных генов и небольшой представленностью их в образцах на БОС ИГЦ. Поэтому гены устойчивости Lr3a, Lr3b не рекомендуется использовать в селекционном процессе из-за высокой частоты встречаемости в Пуховичском районе.

Частоты генов вирулентности p26 и p42 различаются в анализируемых популяциях патогена, но они не превышают 25,5%. Соответственно, гены устойчивости Lr26 и Lr42 являются эффективными для защиты от бурой ржавчины. Учитывая данный показатель, можно сделать вывод о возможности использования данных генов в сортах, выращиваемых в этих районах, но необходимо учитывать, что в случае выращивания сортов, защищенных одним из указанных генов в промышленных масштабах, процент вирулентных клонов резко повысится, и такие сорта станут сильно поражаться бурой ржавчиной.

Гены вирулентности *r9* и *r19* встречаются в популяциях Минского и Пуховичского районов с приблизительно одинаковыми частотами, которые не превышают 3%. Это означает, что гены устойчивости пшеницы к бурой

ржавчине *Lr9* и *Lr19* обеспечивают резистентность более, чем к 97% клонов возбудителя болезни. Поэтому данные гены можно считать высокоэффективным для использования в селекции на иммунитет.

Заключение

Представленные результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о внутрипопуляционной изменчивости патогена по вирулентности и о полиморфизме растения-хозяина по устойчивости. На основании данных о частоте генов вирулентности можно сделать вывод об эффективности генов устойчивости пшеницы к возбудителю бурой ржавчины на территории Беларуси. Резистентность пшеницы к популяции гриба могут обеспечить проростковые гены *Lr9* и *Lr19*. Эти гены в ближайшие годы смогут обуславливать устойчивость пшеницы к большинству клонов возбудителей болезни. Остальные изученные *Lr*-гены обладают слабой защитной ценностью или вообще не обуславливают резистентность к возбудителю бурой ржавчины пшеницы на территории республики.

В начале нашего исследования было сделано предположение, что в центрах выра-

щивания большого разнообразия сортов растения-хозяина наблюдается максимальное разнообразие генотипов облигатных грибных патогенов. Полученные результаты подтвердили данное предположение. Популяции возбудителя бурой ржавчины, собранные на посевах генетических коллекций мягкой пшеницы на БОС ИГЦ (Минский район) и на селекционных посевах на Экспериментальной базе «Зазерье» (Пуховичский район) в 2009 году, характеризовались наличием 59 генотипов патогена, имеющими 26-34 аллелей вирулентности. Данное разнообразие по генотипам значительно большее, чем в проанализированных популяциях, собранных на Государственных сортоиспытательных участках [16].

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского Фонда фундаментальных исследований (Б09-125).

Список использованных источников

1. Лукьяненко, П.П. Селекция устойчивых к ржавчине сортов / П.П. Лукьяненко // Селекция и семеноводство. – 1968. – №4. – С. 10–18.

2. Дмитриев, А.П. Исследование внутрипопуляционных процессов у *Puccinia recondita* Rob. ex Desm f.sp. *tritici* Erikss. и генофонда устойчивости пшениц Закавказья к бурой ржавчине: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / А.П. Дмитриев; ВНИИР. – Л., 1975. – 26 с.

3. Жученко, А.А. Стратегия адаптивной интенсификации сельского хозяйства (концепция) / А.А. Жученко. – Пушино: ОНТИ ПЦН РАН, 1994. – 148с.

4. Лесовой, М.П. Явления потери устойчивости сортов пшеницы к бурой листовой ржавчине и факторы их обуславливающие / М.П. Лесовой // VIII Международный конгресс по защите растений: тезисы докла-

дов советских участников. – М., 1975. – С. 232–233.

5. European virulence survey for leaf rust in wheat / Mesterházy A. [et al.] // Agronomie. 2000. Vol. 20, N7. P. 793–804.

6. Lind, V. Virulence Frequences of *Puccinia triticina* in Germany and the European Regions of the Russian Federation / V. Lind, E. Gulyaeva // Journal of Phytopathology. – 2007. – Vol. 155, N1. – P. 13–21.

7. Маркелова, Т.С. Изучение структуры и изменчивости популяции бурой ржавчины в Поволжье / Т.С. Маркелова // АгроXXI. – 2007. №4–6. – С. 37–40.

8. Population structure of *Puccinia triticina* in Russia during 2007, as assessed by virulence and molecular markers / Gulyaeva E. [et al.] // Abstracts of oral and poster presentation 8th International Wheat Conference (June 1-4, 2010, St. Petersburg, Russia). – St. Petersburg, Russia,

2010. – P. 258–259.

9. Zhemchuzhina, A. Structure of populations *Puccinia triticina* in various regions of Russia in 2006-2008 / A. Zhemchuzhina, N. Kurkova // Abstracts of oral and poster presentation 8th International Wheat Conference (June 1-4, 2010, St. Petersburg, Russia). – St. Petersburg, Russia, 2010. – P. 279.

10. Hanzalova A. Physiologic specialization of wheat leaf rust (*Puccinia triticina* Erikss.) in the Czech Republic in 2001 – 2004 / A. Hanzalova, P. Bartos // Czech J. Genet. Plant Breed. – 2006. – Vol. 42, N4. – P. 126–131.

11. Bartos P. Rust epidemics and their implications in wheat breeding and research in the Czech Republic / P. Bartos // Czech J. Genet. Plant Breed. – 2010. – Vol. 46, N2. – P. 90-96.

12. Genetic protection of wheat from rusts and development of resistant varieties in Russia and Ukraine / A. Morgunov [et al.] // BGRI 2010 Technical workshop oral presentation full papers and

abstracts (May 30-31, 2010 St. Petersburg, Russia). – St. Petersburg, Russia, 2010. – P. 1–20.

13. Михайлова Л.А. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* Rob. ex. Desm. f.sp. *tritici* / Л.А. Михайлова, К.В. Квитко // Микология и фитопатология. – 1970. – Т. 4, вып. 3. – С. 269–273.

14. Mains E.V., Jackson H.S. Physiological specialization in the leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss. / E.V. Mains, H.S. Jackson // Phytopathology. – 1926. – Vol. 16, N 8. – P. 89–120.

15. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Мн.: Вышэйшая школа, 1967. – 328 с.

16. Булойчик А.А. Изменение частоты встречаемости генов вирулентности в белорусской популяции *Puccinia triticina* Erikss. в 1980, 1984 и 1994 гг. / А.А. Булойчик, Е.А. Волуевич // Микология и фитопатология. – 1997. – Т. 31, вып. 5. – С. 55–59.

Дата поступления статьи 22 июля 2010 г.

И.Б. Моссэ¹, А.Л. Гончар¹, Л. В. Кухтинская¹, Н.И. Моссэ², П.Н. Малашевич³, А.В. Семеняков⁴

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К ГИПОКСИИ

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

Гипоксия определяется как пониженное содержание кислорода в тканях организма, наблюдаемое при недостатке кислорода в воздухе и при некоторых заболеваниях. Гипоксия является одним из ведущих факторов, лимитирующих высокие показатели в спорте. Поэтому выявление реакции организма на недостаток кислорода (гипоксию) имеет особое значение для организации тренировочного процесса и соревновательной практики спортсменов.

Адаптация человека к гипоксии представляет собой сложную интегральную реакцию, в которую вовлекаются различные системы организма. Наиболее выраженными оказываются изменения со стороны сердечно-сосудистой системы, аппарата кроветворения, внешнего дыхания и газообмена (в частности, увеличение кислородной емкости крови, повышение концентрации миоглобина и др.) [1]. Вместе с тем, современные исследования показали, что существует значительное многообразие сроков наступления, длительности сохранения, а также выраженности положительного эффекта адаптации у различных спортсменов, что обусловлено их генетическими особенностями.

Биатлон – один из циклических видов спорта, требующих преимущественного проявления выносливости (главным образом в смешанной аэробно-анаэробной зоне). Данная выносливость определяется запасами в организме доступных источников энергии, доставкой кислорода в работающие мышцы и

развитием в работающих мышцах митохондриального окисления. Поэтому для достижения высоких результатов в этом виде спорта особенно важна высокая устойчивость к гипоксии. При подготовке спортсменов с применением методик кратковременной гипоксической тренировки (аппараты типа «горный воздух») и тренировки в условиях среднегорья и высокогорья (продолжительное воздействие гипоксии) большое значение имеет генотип спортсмена.

Цель данной работы – установление частот аллельных вариантов генов, присутствующих в генотипах элитных спортсменов, для выявления наиболее информативных маркеров, определяющих тип, выраженность и стойкость адаптационных реакций на кратковременную и продолжительную гипоксическую тренировку и обеспечивающих высокую устойчивость к гипоксии. В этой связи нами протестированы образцы ДНК членов Национальной олимпийской сборной команды Беларуси по биатлону как носителей наиболее благоприятных генотипов.

Для выявления генетических факторов, способствующих быстрому и адекватному ответу на гипоксический стресс, а также формирующих общую устойчивость к гипоксии, нами были отобраны 9 генов, регулирующих процессы ангиогенеза, вазомоторного контроля, энергетического метаболизма, эритропоэза, синтеза миоглобина и имеющих в своей структуре функциональные полиморфизмы.

Материалы и методы исследования

Исследованы образцы ДНК членов Национальной олимпийской сборной команды Беларуси по биатлону, состоящей из 12 человек основного состава и 6 спортсменов 2-го состава. В качестве контроля исследована ДНК людей, профессионально не занимающихся спортом, в количестве 100 чел. Биологическим материалом для исследования служила ДНК, экстрагированная из пятен крови, высушенных на специальных бланках, или ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови.

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.

Для анализа полиморфизмов I/D гена ACE, +9/-9 гена BDKRB2 и 4a/4b гена eNOS использован метод прямого определения разницы в электрофоретической подвижности фрагментов ДНК в полиакриламидном геле.

Аллели полиморфизмов A79G гена MB и G298T гена eNOS идентифицировали по наличию или отсутствию сайта рестрикции после обработки продуктов ПЦР соответствующими эндонуклеазами и электрофоретического разделения в полиакриламидных или агарозных гелях.

Определение микросателлитных CA-повторов в генах ENDT-1, eNOS и полиморфизмов 4G/5G в гене PAI-1 проводили с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310.

Идентификацию однонуклеотидных замен в генах HIF1A, EPO и VEGF выполняли методом ресеквенирования.

Для оценки параметров работоспособности спортсменов в условиях гипоксии использовали комплекс клинических, педагогических, функциональных, гематологических, биохимических, гормональных исследований в соответствии с индивидуальным планом медико-биологического обеспечения спортсменов национальной команды Республики Беларусь по биатлону.

Результаты и обсуждение

Для тестирования на устойчивость к гипоксии нами отобраны 12 полиморфных вариантов в 9 генах, кодирующих белки, участвующие в реакции организма на недостаток кислорода. Гены условно были разбиты на группы:

1. Ген, индуцируемый гипоксией фактора I (HIF1A) – ведущий транскрипционный регулятор генов, детерминирующих факторы адаптации к гипоксии.
2. Гены, кодирующие регуляторные белки сердечно-сосудистой системы:
 - ген ангиотензин-конвертирующего фермента (ACE),
 - ген эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS),
 - ген рецептора брадикинина (BDKRB2),
 - ген эндотелина (ENDT1).
- 2.1. гены роста эндотелия сосудов
 - ген ингибитора активатора плазминогена I (PAI-1),

- ген сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF),
3. Гены, детерминирующие факторы адаптации системы транспорта кислорода:
 - ген эритропоэтина (EPO),
 - ген миоглобина (MB).

HIF1 считается ведущим транскрипционным регулятором генов, ответственных за реакцию на недостаток кислорода.

Ген HIF1A локализуется на 14 хромосоме (14q21-q24), состоит из 15 экзонов и кодирует субъединицу HIF1a. Субъединица HIF1a является кислородчувствительной, имеет специфическую функцию в стимулированной гипоксией генной регуляции и является мишенью для кислородчувствительных сигнальных путей. Недостаток кислорода ведет к активации гена HIF1A, который в свою очередь запускает экспрессию гипоксия-зависимых генов – ACE,

eNOS, PAI-1, BDKRB2, EPO, VEGF и ENDT1.

В гене HIF1A нами был полностью просканирован участок ДНК, кодирующий домен кислород-зависимой деградации белка. В этом фрагменте имеется несколько полиморфизмов, в том числе наиболее частые – 582С/Т и 588G/A. Их функциональная значимость заключается в изменении структуры участка связывания белка с фактором деградации, что приводит к увеличению концентрации HIF1 даже в присутствии кислорода. Распространенность аллеля 582Т в европейской популяции – 9–10%. По данным [3] этот маркер ассоциирован с высокими аэробными возможностями, однако различия в частотах аллелей у спортсменов и в контроле по результатам данной работы незначительны. Частота аллеля 588G составляет в европейской популяции – 2–3%.

При тестировании олимпийской сборной команды у трёх человек первого состава выявлены варианты G редкого полиморфизма 588G/A и в одном образце обнаружен аллель Т полиморфизма 582С/Т, обеспечивающие значительно более высокий уровень HIF1 даже при нормальной концентрации кислорода. В образцах второй протестированной группы данные варианты не выявлены. Высокая частота редкого аллеля 588G – 12,5% у представителей первой сборной команды свидетельствует о селекции этих спортсменов по данному маркеру и о его значительной роли в обеспечении высокой устойчивости к гипоксии.

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

АСЕ – фермент ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем – гуморальных регуляторов артериального давления. Под действием АСЕ образуется ангиотензин-II – сильнейший сосудосуживающий агент и разрушается брадикинин, ответственный за вазодилатацию [4]. Ген АСЕ картирован в 17 хромосоме (17q23) и состоит из 26 экзонов, протяженностью в 21 тнп [5]. В настоящее время известны более 160 полиморфизмов гена, но определяющим предрасположенностью к разным видам физической деятельности является I/D полиморфизм 16 интрона [6]. Полиморфизм гена АСЕ связан

с инсерцией (I) или делецией (D) 287 нуклеотидов [5]. Генотип I/I по гену АСЕ ассоциирован со сниженной концентрацией фермента и обеспечивает в 7–8 раз большую физическую работоспособность и лучшую адаптацию организма к тренировкам, чем генотип D/D. Следует отметить, что любая мышечная деятельность не изменяет уровень активности АСЕ в крови [4].

Частота встречаемости генотипа II гена АСЕ у жителей европейских стран колеблется от 16% в Испании, 19,6% в Германии до 24% в Великобритании и у жителей Санкт-Петербурга [4]. Встречаемость I аллеля у европейцев составляет 40–50% по данным разных авторов, а в популяции белорусов – 50,7% [6].

По данным Астратенковой И.В. [4] у российских биатлонистов I аллель встречается с частотой 54,5% (56,5% у мужчин и 52,5% у женщин). В целом, в видах спорта, требующих преимущественного проявления выносливости, частота I аллеля составила 51,5%, а в смешанных видах спорта – 63%.

Распределение частот генотипов и аллелей по гену АСЕ в группе белорусских биатлонистов высшей квалификации представлено в таблице 1.

По результатам тестирования нами не выявлено существенного, по сравнению с популяционной частотой, превалирования предпочтительного варианта I/I, как и аллеля I в обеих группах. Очевидно, вклад данного полиморфизма гена АСЕ в устойчивость к гипоксии не является определяющим.

ENDT1 является главным вазоконстрикторным белком. Сосудосуживающий потенциал эндотелина-1 в 10 раз выше, чем у ангиотензина-II. Эндотелин-1 не накапливается в эндотелиальных клетках, но очень быстро образуется под воздействием многих факторов как средовых (гипоксия, ишемия, острый стресс), так и физиологических (адреналин, ангиотензин-II, вазопрессин, тромбин). В физиологических концентрациях эндотелин действует на эндотелиальные рецепторы, вызывая высвобождение факторов релаксации, а в более высоких – активирует рецепторы на гладкомышечных клетках, стимулируя стойкую вазоконстрикцию.

Анализ варибельной (CA)_n последовательности гена выявил в обеих группах отсутствие отрицательных вариантов генов, од-

нако количество предпочтительных гомозигот и в том, и в другом составе оказалось меньше, чем частота гетерозигот (таблица 1). Тем не менее, частоты положительных аллелей в обеих группах существенно превышают частоты отрицательных.

eNOS катализирует реакцию образования окиси азота (NO) из L-аргинина. Окись азота является мощным эндотелиальным фактором релаксации и играет важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов (вазодилатация), в работе гладкомышечной мускулатуры сосудистой стенки. Ген eNOS расположен на хромосоме 7q35–36 и состоит из 26 экзонов. В гене eNOS имеется несколько функционально значимых полиморфизмов, влияющих на уровень синтеза NO.

Полиморфизм 4a/4b гена eNOS. Генотип 4b/4b дает более высокую концентрацию NO и ассоциирован с проявлением выносливости и с предрасположенностью к выполнению длительной физической работы. Генотип с двумя вариантами 4a сочетается с артериальной гипертензией, снижением эластичности сосудистой стенки и гипертрофией миокарда. Наличие уже одного аллеля 4a может быть причиной снижения выработки NO, поэтому гетерозиготы (генотип 4a/4b) рассматриваются как нежелательные варианты.

Частота гомозиготного генотипа 4a/4a среди жителей разных стран составляет 2–3%, в Белоруссии 4,3% [6]. По данным О.С. Глотова носители генотипа 4a/4a гена eNOS среди спортсменов встречаются редко [7]. В группе видов спорта с преимущественным развитием выносливости, куда входит и биатлон, встречаемость генотипа 4b/4b по данным работы [7] составляет 52%.

Полученные нами частоты генотипов биатлонистов представлены в таблице 1. Среди биатлонистов высшей квалификации не обнаружено ни одного носителя генотипа 4a/4a, а генотипы 4b/4b выявлены у 81,8 % спортсменов первого состава, что существенно превышает данные О.С. Глотова, и 57,1% у представителей второго состава.

Полиморфизм G/T в гене eNOS приводит к замещению глутаминовой кислоты на аспарагиновую в 298–м положении белковой молекулы эндотелиальной синтазы NO.

Генотип T/T ассоциирован со снижением ак-

тивности фермента и соответственно с более низким уровнем NO.

По результатам тестирования в обеих группах биатлонистов выявлено превышение частот генотипов G/G и аллелей G по сравнению с неблагоприятными (таблица 1). Так, среди биатлонистов первого состава частота благоприятного аллеля G составляет 72,7%, а аллеля T – 27,3%, среди спортсменов второго состава – 64,5% и 35,5% соответственно.

Анализ варибельной (CA)_n последовательности в гене eNOS не выявил отрицательных вариантов данного полиморфизма. Все биатлонисты оказались носителями или положительными вариантами гена, или гетерозиготами (таблица 1).

Ген BDKRB2 (14q23) кодирует β 2–рецептор брадикинина [8]. Брадикинин является мощным вазодилататором, вызывающим образование простаглицина, окиси азота и эндотелиального гиперполяризующего фактора.

В гене BDKRB2 нами протестирован полиморфизм, представляющий собой девяти-нуклеотидную делецию/инсерцию (–9/+9). Делеция в 1–м экзоне ассоциирована с высоким уровнем экспрессии гена, усилением метаболизма глюкозы в мышцах, повышенной выработкой NO.

По данным [9] вариант –9/–9 среди белорусских спортсменов циклических и смешанных видов спорта встречается в 26,8%, а в контроле (лица, не занимающихся профессиональным спортом) – 15,3% [10].

Результаты проведенного нами тестирования Олимпийской команды показали, что частота положительных вариантов гена (–9/–9) в первой группе спортсменов составляет 36,4%, что также превышает не только популяционный уровень, но и частоту, выявленную у спортсменов средней квалификации [9], а отрицательный (+9/+9) обнаружен лишь у 18,2% человек (таблица 1). Во второй группе результаты значительно отличаются – не обнаружено положительных вариантов, а отрицательные варианты выявлены в 28,6% случаев.

Таким образом, именно генотип –9/–9 является наиболее благоприятным для спортсменов, тренирующихся на развитие аэробной выносливости. Исследование данного полиморфизма гена BDKRB2 является важным в определении генетической устойчивости к недостатку кислорода.

Таблица 1

Частоты генотипов и аллелей генов, детерминирующих факторы адаптации сердечнососудистой системы к гипоксии, в команде биатлонистов

Вариант гена/%	Генотипы						Аллели			
	1-й состав			2-й состав			1-й состав		2-й состав	
ACE	I/I	I/D	D/D	I/I	I/D	D/D	I	D	I	D
%	27,3	63,6	9,1	42,8	28,6	28,6	59,1	40,9	57,1	42,9
ENDT1	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-	+	-	+	-
%	36,4	63,6	0	42,9	57,1	0	68,2	31,8	71,5	28,5
eNOS a/b	b/b	a/b	a/a	b/b	a/b	a/a	b	a	b	a
%	81,8	18,2	0	57,1	42,9	0	90,9	9,1	78,5	21,5
eNOS G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	G	T	G	T
%	54,5	36,4	9,1	42,9	42,9	14,2	72,7	27,3	64,5	35,5
eNOS(CA)n	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-	+	-	+	-
%	36,4	63,6	0	42,9	57,1	0	68,2	31,8	71,5	28,5
BDKRB2	-9/-9	+9/-9	+9/+9	-9/-9	+9/-9	+9/+9	-9	+9	-9	+9
%	36,4	45,4	18,2	0	71,4	28,6	59,1	40,9	35,7	64,3

Примечание: жирным шрифтом выделены варианты, где частота благоприятных генотипов или аллелей существенно превосходит частоту неблагоприятных

Выделенные жирным шрифтом варианты генотипов и аллелей свидетельствуют об их более высокой информативности для анализа устойчивости к гипоксии.

Подгруппа генов роста эндотелия сосудов

VEGF играет центральную роль в процессе ангиогенеза, являясь основным фактором роста эндотелия сосудов. VEGF влияет на развитие новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и выживание незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка). Концентрация VEGF непосредственно регулируется такими факторами окружающей среды, как pH, давление и концентрация кислорода. Общее влияние этих факторов заключается в опосредованной через VEGF стимуляции важных для ангиогенеза антиапоптотических белков, цитокинов, молекул клеточной адгезии и металлопротеиназ [11,12]. Синтез VEGF увеличивается под влиянием аэробных тренировок, а при воздействии гипоксии и забега на сверхдлинные дистанции – снижается [11].

Ген VEGF локализован в 6 хромосоме (6p12) [14]. В гене выявлено несколько полиморфных вариантов, наиболее значимый из которых – однонуклеотидная замена в положении

– С634G регуляторной части гена. В работе [10] показано, что средняя частота аллелей G и C в мире составляет около 70% и 30% соответственно.

В результате тестирования нами показано, что вариант G гена присутствует в 86,4% генотипов биатлонистов основного состава и 71,5% биатлонистов второй группы. Генотипы C/C в обеих группах не выявлены (таблица 2).

РАI-1 является одним из основных компонентов антисвертывающей системы крови, обеспечивает до 60% общей ингибиторной активности в отношении активатора плазминогена в плазме [13]. В норме в крови находится неактивный предшественник плазмина – плазминоген, а РАI-1 регулирует уровень тканевого и урокиназного активаторов плазминогена. Повышение уровня РАI-1 при гипоксии приводит к снижению фибринолиза и образованию фибриновой основы для роста сосудов в процессе ангиогенеза.

Показано, что уровень РАI-1 в плазме крови ассоциирован с полиморфизмом в области промотора гена РАI-1, представляющего собой однонуклеотидную делецию/инсерцию гуанина (4G/5G). Механизм, лежащий в основе аллельных различий в уровне синтеза РАI-1,

был установлен после обнаружения того, что оба аллеля могут связываться с активатором транскрипции гена, тогда как аллель 5G имеет также сайт связывания с транскрипционным репрессором [14]. Отсутствие действия репрессора и обеспечивает более высокий уровень транскрипции гена PAI-1 с аллелем 4G.

Люди, имеющие в обеих хромосомах полиморфный вариант 4G гена PAI-1, обладают на 25% более высоким уровнем содержания PAI-1 в плазме, чем гомозиготные по 5G.

Нами ранее показано, что популяционная частота аллеля 4G для Белоруссии составляет 53,7%, а аллеля 5G – 46,3%. При этом частота гомозиготных носителей аллеля 4G для Белоруссии составляет 28,7%, гетерозиготных носителей данного аллеля – 50%, а гомозиготных носителей аллеля 5G – 21,3% [15].

Частоты встречаемости данной мутации в разных странах колеблются. Близкие к бело-

русской популяции значения характерны для США (4G/4G – 29,0%, 4G/5G – 47,0%, 5G/5G – 24,0%), Швеции (31,0%, 47,0%, 22,0% соответственно) и Чехии (28,2%, 47,9%, 23,9%). В то же время в странах, наиболее близких к Беларуси территориально и этнически, имеются заметные различия. Так, в России частота мутации составляет: 4G/4G – 35,5%, 4G/5G – 46,9%, 5G/5G – 17,6%; Польше – 17,8%, 45,3%, 34,9% соответственно.

При ДНК-тестировании команды биатлонистов нами установлено, что в обеих группах преобладают благоприятные генотипы 4G/4G. В первой группе их 63,5%, а во второй – 42,9% (таблица 2), что существенно выше популяционной частоты для Белоруссии, составляющей 28,7%.

Таким образом, можно предположить, что тестирование полиморфизма 4G/5G гена PAI-1 является важным при оценке устойчивости спортсмена к гипоксии.

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей генов роста эндотелия сосудов в команде биатлонистов

Вариант гена/%	Генотипы						Аллели			
	1-й состав			2-й состав			1-й состав		2-й состав	
VEGF	G/G	C/G	C/C	G/G	C/G	C/C	G	C	G	C
%	72,7	27,3	0	42,9	57,1	0	86,4	13,6	71,5	28,5
PAI-1	4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G	5G	4G	5G
%	63,5	27,3	9,1	42,9	42,9	14,2	77,2	22,8	64,4	35,6

Примечание: жирным шрифтом выделены варианты, где частота благоприятных генотипов или аллелей существенно превосходит частоту неблагоприятных

Гены, детерминирующие факторы адаптации системы транспорта кислорода.

ЕРО – один из наиболее важных факторов эритропоэза и ангиогенеза. Препарат, содержащий данный фактор, широко используется в мире для лечения анемии и повышения уровня гемоглобина в крови. Ген, кодирующий данный белок, располагается на участке 7q21. В промотерной части гена имеется несколько полиморфизмов, часть из которых могут изменять уровень экспрессии гена, что приводит к фенотипическим проявлениям. Одним из таких вариантов является однонуклеотидная замена G/T в положении –1125. В единственной опубликованной на сегодняшний день работе

установлено, что генотип T/T обеспечивает повышение концентрации эритропоэтина в некоторых органах и тканях в 7,5 раз [18]. В этом мультицентровом исследовании приведена также популяционная частота аллелей, которая для варианта T/T составляет 26%.

Результаты нашего тестирования показали, что положительный генотип T/T в первой группе имеют 54,5 % человек (63,6% аллеля T), в то время как во второй группе положительных вариантов не выявлено, а большинство спортсменов (71,4%) являются гетерозиготами (таблица 3).

МВ – железосодержащий белок мышечных клеток, аналог гемоглобина эритроцитов кро-

ви. МВ отвечает за транспорт кислорода в скелетных мышцах и в мышце сердца, запасание (депонирование) молекулярного кислорода и передачу его окислительным системам клеток. Ген миоглобина локализован на длинном плече хромосомы 22 (22q11.2–q13) [16]. В гене МВ протестирован функциональный вариант А79G (однонуклеотидная замена).

Литературные данные по исследованию гена миоглобина очень ограничены. По сведениям J. Wu [17] и E. Fernandez [16] среди представителей европеоидной расы частота 79A полиморфизма составляет 46%, негроидной расы – 41%. Наибольшая частота встречаемости данного аллеля наблюдается среди коренного населения Северного Китая – 72% и у жителей Японии – 75,5% [17]. При этом частота

генотипа GG среди китайцев составляет 7%, генотипа AA – 52% и генотипа AG – 41%.

Согласно полученным нами данным, частота аллели 79A в популяции Беларуси близка к литературным данным и составляет 40,7%, а частота генотипа AA – 3,6%. Достоверных различий по данному полиморфизму гена миоглобина между спортсменами–биатлонистами и в контроле нами не обнаружено (таблица 3), что совпадает с данными J. Wu [17].

Отсутствие среди спортсменов высшей квалификации гомозигот AA требует дальнейшего исследования и, вероятно, указывает на то, что генетическая детерминированность уровня миоглобина не является определяющей в связи с вариабельностью уровня его экспрессии.

Таблица 3

Частоты генотипов и аллелей генов, детерминирующих факторы адаптации системы транспорта кислорода, в команде биатлонистов

Вариант гена/%	Генотипы						Аллели			
	1–й состав			2–й состав			1–й состав		2–й состав	
ЕРО	Т/Т	Г/Т	GG	Т/Т	Г/Т	Г/Г	Т	Г	Т	Г
%	54,5	18,2	27,3	0	71,4	28,6	63,6	36,4	35,7	64,3
МВ	А/А	А/Г	Г/Г	А/А	А/Г	Г/Г	А	Г	А	Г
%	0	81,8	18,2	0	85,7	14,3	40,9	59,1	42,8	57,2

Примечание: жирным шрифтом выделены варианты, где частота благоприятных генотипов или аллелей существенно превосходит частоту неблагоприятных

Таким образом, тестирование биатлонистов высшей квалификации по всему комплексу признаков показало существование генетических различий, как между спортсменами, так и между основным и резервным составами команды. Это наглядно проявляется при сравнении количества благоприятных и неблагоприятных генотипов у разных представителей команды (таблица 4).

Данные таблицы 4 указывают на то, что исследуя большое количество ДНК–маркеров, можно выявить генетические различия

даже на уровне основного и резервного составов сборной команды страны. Лучшие из протестированных биатлонистов имеют в своих генотипах до 75% благоприятных генных вариантов и лишь 8% нежелательных. Полученные данные позволяют анализировать результаты подготовки спортсменов с учетом их генетического статуса, корректировать тренировочный процесс и подбирать индивидуальное медико–биологическое обеспечение.

Таблица 4

Соотношение благоприятных и неблагоприятных генотипов у разных представителей команды

	1 состав			2 состав			
	+/+	+/-	-/-		+/+	+/-	-/-
2	9	1	2	1	7	–	5
1	9	2	1	1	6	4	2
1	8	2	2	1	6	5	1
2	8	3	1	1	5	6	1
1	7	3	2	1	4	5	3
2	7	4	1	1	4	7	1
1	6	4	2	1	3	8	1
1	5	5	2				

*+/+ – гомозигота по благоприятному аллелю

*+/- – гетерозигота

*-/- – гомозигота по неблагоприятному аллелю

Заключение

В результате тестирования показано, что частоты положительных вариантов по большинству генов у биатлонистов высшей квалификации значительно превышают средние показатели, характерные для населения в целом, что говорит о наличии у данных спортсменов хорошей генетической составляющей, необходимой для достижения высоких спортивных показателей. Комплексный молекулярно–генетический анализ по 12 ДНК–маркерам позволил выявить различия, как между отдельными представителями команды, так и между двумя группами спортсменов – в генотипах биатлонистов основного состава выявлено больше предпочтительных аллелей и меньше нежелательных вариантов генов, чем в генотипах резервной группы.

Полученные результаты позволяют заключить, что генетический анализ полиморфных аллелей исследованных генов может быть использован в составе диагностического комплекса для оценки устойчивости и проявления физических качеств человека в условиях гипоксии. Использование данных в практической работе тренеров позволит повысить эффективность профессиональной подготовки и сохранить здоровье спортсменов при реализации индивидуальной тренировочной программы. Выявление отдельных неблагоприятных генных вариантов у представителей сборной команды дает возможность корректировки соответствующих эффектов с помощью индивидуального медико–биологического обеспечения.

Список использованных источников

1. Булатова, М.М. Среднегорье, высокогорье и искусственная гипоксия в системе подготовки спортсменов / М. М. Булатова, В. Н. Платонов // Спортивная медицина – 2008. – № 1. – с. 95 – 119.

2. An, W.G. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1a./ W.G. An [et al.] // Nature. – 1998 – 392. – P. 405–408.

3. 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.

4. Астратенкова, И.В. Анализ полиморфизма гена ACE у спортсменов/ И.В. Астратенкова, А. И. Комкова // Сб. науч. тр./ Федеральное агентство по физической культуре и спорту, Санкт–Петербургский научно–исследователь-

ский институт физической культуры; под ред. В. А. Рогозкина – СПб. – 2006. – С. 33–44.

5. 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.

6. Сивицкая, Л.Н. Генетическая структура популяции белорусов по данным анализа аутосомных молекулярных маркеров: дис. канд. биол. наук: 03.00.26./ Л. Н. Сивицкая // ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» – Минск, 2008. – 122 с.

7. Глотов, О.С. Исследование функционально-значимого полиморфизма ACE, AGTR1, eNOS, MTHFR, MTRR и APOE генов в популяции Северо-Западного региона России. / О.С. Глотов [и др.] // *Экологическая генетика*. – 2004. – Вып.3. – С.32–35.

8. Ma, J.X. Structure and chromosomal localization of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B2 receptor / J. X. Ma [et al.] // *Genomics*. – 1994. – 23. – P. 362 – 369.

9. Синелев, В.А. Связь полиморфизма генов BDKRB2 и NOS3 с физической работоспособностью человека / В.А. Синелев [и др.] // *Научно-практические проблемы спорта высших достижений: материалы Международной конференции г. Минск, 4–5 декабря 2008 г./ НИИ физической культуры и спорта Республики Беларусь; под ред. А.В. Григорова – г. Минск – 2008. – с. 241–245.*

10. Williams, A. G. Similarity of polygenic profiles limits the potential for elite human physical performance / A.G.Williams, J.P. Folland// *Physiol.* – 2008. – No. 1. – P. 113–121.

11. Efthimiadou, A. The angiogenetic effect

of intramuscular administration of VEGF on muscle. The influence of exercise on angiogenesis / A. Efthimiadou [et al.] // *In Vivo*. – 2004. – V. 18. – P. 825 – 829.

12. 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. – № 4. – P. 477–481.

13. Schneiderman J, Sawdey MS, Keeton MR, Bordin GM, Bernstein EF, Dilley RB, Loskutoff DJ. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries / *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. – № 89 – P. 6998 –7002.

14. Eriksson P, Kallin B, Hoofst FM, 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 U S A*. 1995. – № 92 – P. 1851–1855.

15. Гончар, А.Л. Ассоциация полиморфных вариантов гена *pa1-1* и мутации *factor v leiden* с генетической предрасположенностью к инфаркту миокарда / А.Л. Гончар [и др.] // «Молекулярная и прикладная генетика» – 2009. – т. 9. – с. 101–107.

16. Fernandez, E. Analysis of the Myoglobin Gene in Heart Disease / E. Fernandez [et al.] // *Human mutations* – 1997. – № 9 – P. 426 – 430.

17. Wu, J. SNP A79G in the second exon of the myoglobin gene in elite long distance runners/ J. Wu, Y. Hu, G. Liu // *Br J Sports Med*. – 2005. – V. 39. – P.781–782.

18. Patel, S. Promoter polymorphism of the erythropoietin gene in severe diabetic eye and kidney complications/ S. Patel [et al.] // *PNAS* – 2008.– V.105 – P. 6998–7003.

Дата поступления статьи 6 сентября 2010 г.

ИНТЕНСИВНОСТЬ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАЦИОННЫХ СОБЫТИЙ В ОБЛАСТИ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ У ЧЕЛОВЕКА

Институт Репродуктивной Генетики,
Чикаго, США

Введение

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что рекомбинационные события в геноме человека распределены не случайно, а сконцентрированы на небольших участках размером всего несколько тысяч пар оснований (т.п.о.), называемых горячими точками рекомбинации (ГТР). Горячие точки рекомбинации разделены протяженными фрагментами ДНК с низкой рекомбинационной активностью (холодные точки рекомбинации или рекомбинационными пустыни) [1]. Изучение распределения ГТР в геноме человека и построение рекомбинационных карт имеет важное как теоретическое, так и прикладное значение. Во-первых, точная локализация ГТР способствует изучению процесса рекомбинации и механизмов ее регуляции. Несмотря на то, что сам механизм гомологичной рекомбинации у эукариот довольно хорошо изучен, пока нет четкого представления о том, какие факторы отвечают за инициацию рекомбинации на том или ином участке генома. Во-вторых, данные о ГТР позволяют моделировать эволюцию отдельных участков генома [2]. В-третьих, построение точных рекомбинационных карт позволяет оптимальный подбор маркеров для современных полногеномных исследований ассоциаций (Genome Wide Association studies) и тем самым в значительной степени определяет успех и эффективность данных исследований [3].

Существует три подхода к изучению распределения горячих точек рекомбинации у человека: анализ сцепления маркеров в родословных, генотипирование ДНК сперматозоидов и компьютерное моделирование на основе популяционных исследований однонуклеотидных

полиморфизмов (ОНП). Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки. Метод родословных был самым первым методом, который использовался для изучения генетической рекомбинации и построения генетических карт. Недостатком метода является то, что он не дает статистически достоверных результатов вследствие малого размера анализируемых родословных [4]. Генотипирование сперматозоидов позволяет проанализировать огромное количество продуктов мейоза и получить статистически достоверный результат, однако является дорогостоящим и трудоемким, а также позволяет оценить частоту рекомбинации только у мужчин [5]. Популяционные исследования сцепления полиморфизмов отражают не реальную, а исторически сложившуюся картину распределения рекомбинационных блоков, которая может не соответствовать действительной вследствие быстрой эволюции горячих точек рекомбинации [6].

Повышенный интерес к изучению рекомбинации в области главного комплекса гистосовместимости, или МНС (Major Histocompatibility Complex), обусловлен не только участием HLA генов в иммунном ответе, но и его ассоциацией с рядом воспалительных и хронических заболеваний, например, таких как диабет типа 1, ревматоидный артрит, системная красная волчанка и др. [7].

В 2002 году группой исследователей штата Мэриленд было генотипировано 20000 единичных сперматозоидов для построения рекомбинационной карты МНС области [8]. Результаты данного исследования, а также данные анализа ОНП в популяциях на сегодняшний день являются основным источником

информации о рекомбинации в МНС и основой для построения рекомбинационной карты данной области генома. Тем не менее, информация о рекомбинации в МНС все еще является неполной. Результаты анализа спермы, несмотря на огромное количество исследованных гамет, имеют целый ряд неточностей. Во-первых, построенная карта отражает распределение рекомбинаций только у мужчин. Во-вторых, в исследовании использовалась сперма, полученная всего от 12 доноров, двое из которых монозиготные близнецы, и двое братья с идентичным HLA (Human Leukocyte Antigen) гаплотипом, сводя общее количество независимых HLA хромосом до 20. Рядом исследователей было доказано, что существуют значительные различия в частоте и локализации рекомбинации у мужчин и женщин, а также существуют значительные межличностные колебания в распределении рекомбинаций на различных участках генома [9].

В течение последнего десятилетия широкое распространение получила предимплантаци-

онная генетическая диагностика (ПГД), позволяющая установить генотип будущего ребенка до имплантации [10]. Разновидностью ПГД является HLA генотипирование эмбрионов человека, которое применяется для предимплантационного подбора совместимого донора для лечения больного сибса. Методы HLA генотипирования, основанные на использовании STR маркеров, позволяют обнаружить и локализовать горячие точки рекомбинации на микроуровне не только у мужчин, но и у женщин, поскольку дают возможность анализа в реальном времени огромного количества женских мейозов, обычно не доступных для изучения. Исследование же большого количества эмбрионов позволяет получить статистически достоверные результаты.

Задачей исследования являлось изучение частоты и распределения генетической рекомбинации внутри фрагмента, включающего главный комплекс совместимости, у женщин и мужчин с использованием данных предимплантационного HLA генотипирования.

Материал и методы исследования

В качестве материала для исследования использовались единичные бластомеры, выделенные из эмбрионов на 3-й день развития после оплодотворения *in vitro*, и принадлежащие супружеским парам, нуждающимся в подборе HLA совместимого донора для лечения больного ребенка. Биопсия бластомеров проводилась только после подписания пациентом формы информированного согласия. Всего в исследовании принимали участие 110 супружеских пар (220 человек), в возрасте от 24 до 49 лет, прошедших через ЭКО/ПГД программу, включавшую предимплантационное HLA генотипирование.

Единичные бластомеры были получены методом механической биопсии эмбрионов на стадии 6-12 клеток и лизированы с использованием буфера, содержащего протеиназу К (0.2 мг/мл), 0.1% Тритон X100, 0.1% Твин 20. Подбор STR маркеров в области 6p21 осуществлялся с использованием электронных баз данных The Genome Database (www.gdb.org) и dbMHC, а также программы-браузера Ensemble (www.ensemble.org). Дизайн праймеров для амплификации полиморфных

STR-локусов в области МНС производился с использованием программного обеспечения PrimerPremier (Biosoft International). Во внутренний праймер для амплификации каждого локуса была введена флуоресцентная метка (молекула флуорофора FAM или HEX) для последующей детекции полиморфного ПЦР продукта с помощью капиллярного электрофореза. Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 1.

Для анализа единичных бластомеров использовалась мультиплексная двухступенчатая ПЦР с вложенными праймерами (nested). Первый раунд амплификации проводили в объеме 75 мкл, содержащем 10 mM трис-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1,75 mM MgCl₂, 6% DMSO, 100 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (дНТФ), 2 единицы ДНК-полимеразы Taq (Bioline), 5 пикомоль каждого внешнего праймера. Вторые раунды ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 10 mM трис-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 6% DMSO, 1.5 MgCl₂, 56 мкМ каждого дНТФ, 0.75 единицы ДНК-полимеразы Taq (Bioline), 7 пикомоль каждого праймера и 2 мкл ПЦР продукта первого раунда. Детек-

ция и анализ продуктов амплификации проводилась методом капиллярного электрофореза с использованием автоматического генетического анализатора ABI PRISM 3130xl.

Таблица 1

Последовательности и 5' модификация праймеров, использованных для амплификации полиморфных STR маркеров в области бр21

STR-маркер	Праймер	Нуклеотидная последовательность и 5' модификация	Комбинации праймеров	Размер продукта, п.н.	Т отжига	
1	D6S248	D6S248-F D6S248-R D6S248-INS	5' GACTCTCAATCCTCGTTAATGC 5' CAAAAAGAAGCTGCCAAATACAA 3' 5' \HEX\AGGAATGGTGAGAAGGGAAA 3'	1 Раунд F+ R	350	52°C
			2 Раунд F+ INS	250-280	52°C	
2	D6S1624	D6S1624-F D6S1624-R D6S1624-INS	5' TTGGCTGTTTTCTGAAAATT 3' 5' AATAACTTGCTAGGTTTAAGACTTT 3' 5' \HEX\AAATAATTACGTCCTATCAGTAA3'	1 Раунд F+ R	207-221	52°C
			2 Раунд F+ INS	177-191	52°C	
3	D6S258	D6S258-F D6S258-R D6S258-INS	5' ATCAAGAATGTAATCCCTTT 3' 5' TTCATTTGTTTGTGTCATC 3' 5' \FAM\TTCAGCAGTGCTTTGTAGTT 3'	1 Раунд F+ R	175-194	53°C
			2 Раунд F+ INS	125-144	52°C	
4	D6S2972 (MOG)	D6S2972-F D6S2972-R D6S2972-INS	5' CGAGTGAGTCTCTTATTCTTTC 3' 5' GGTAAGTGAAGCATTGAAAAG 3' 5' \FAM\GATAAAGGGGAAGTACTACA	1 Раунд F+ R	190-210	55°C
			2 Раунд F+ INS	160-186	55°C	
5	D6S2971 (RF)	D6S2971-F D6S2971-R D6S2971-INS	5' TCAGGTACAACCTTTCCAGAGA 3' 5' GCTTGGTGCCAGACAATG 3' 5' \FAM\AGAATGAAGGTCTAGAGACAGTT 3'	1 Раунд F+ R	180-300	60°C
			2 Раунд F+ INS	130-250	55°C	
6	D6S510	D6S510-F D6S510-R D6S510-INS	5' CAACACACTGATTTCCATAGC 3' 5' AATGGGCTACTACTTCACACC 3' 5' \HEX\CACTTTGTCTTCCCAATGTA 3'	1 Раунд F+ R	179-195	55°C
			2 Раунд R+INS	149-165	55°C	
7	D6S265	D6S265-F D6S265-R D6S265-INS-F D6S265-INS-R	5' AAGCCAGGCACAGAAA 3' 5' GTGTGGGAACATTACAAG 3' 5' ATCGAGGTAAACAGCAGAAAAG 3' 5' \FAM\AGTCAACCTACTGTGCTATC 3'	1 Раунд F+ R	300	56°C
			2 Раунд INS-F + INS-R	172-182	55°C	
8	9N-2	9N2-F 9N2-R 9N2-INS	5' TCAACACACCGTCTTCCCT 3' 5' GGGCCAGCAGGGTTTA 3' 5' \FAM\GTTAGGACATGTGTCCTACAAG 3'	1 Раунд F+ R	167-180	53°C
			2 Раунд F+ INS	131-140	55°C	
9	MIC A	MIC-F MIC-R MIC-INS	5' GGTGCTTCAGAGTCATTGGC 3' 5' ATCTCCAGAAAGTCCCG 3' 5' \FAM\CGCTTTTCTCACCTGGACC 3'	1 Раунд F+ R	150-173	55°C
			2 Раунд F+ INS	130-143	55°C	
10	D6S2673 (MIB)	D6S2673-F D6S2673-R D6S2673-INS	5' GCTTCACCCGATCAGTAGA 3' 5' AGAAGCAGAATCAATAGGG 3' 5' \HEX\CCTGCAGATTTCTACTTAC 3'	1 Раунд F+ R	230-250	53°C
			2 Раунд R+INS	142-160	55°C	
11	D6S2792 (TNF-A)	D6S2792-F D6S2792-R D6S2792-INS	5' GCACTCCAGCCTAGGCCACAGA 3' 5' GCCTCTAGATTTCAATCCAGCCACA 3' 5' \FAM\CCTCTCTCCCTGCAACACACA 3'	1 Раунд F+ R	216	60°C
			2 Раунд R+INS	100-112	60°C	
12	D6S273	D6S273-F D6S273-R D6S273-INS	5' AGCTAAATGCAATGTAGGA 3' 5' GCCAAAGTTAAAACCAAAC 3' 5' \FAM\ACCAAACCTCAAATTTTCGG 3'	1 Раунд F+ R	290	55°C
			2 Раунд F+ INS	266-279	55°C	
13	D6S2885 (LH1)	D6S2885-F D6S2885-R D6S2885-INS	5' GAGACAATGCCTAGAACCAA 3' 5' TAGGAAGAAGGTGACCTGGAC 3' 5' \FAM\CTATGCTAGTCTGTGCCAAGG 3'	1 Раунд F+ R	185-205	56°C
			2 Раунд R+INS	148-180	55°C	
14	D6S2447	D6S2447-F D6S2447-R D6S2447-INS	5' CATGTTACCCAGGCTTGG 3' 5' GTTCTTTTTGCGTCTATTTT 3' 5' \FAM\AAGTTGTTAAAACCTCTGGTAGACA 3'	1 Раунд F+ R	180-200	55°C
			2 Раунд R+INS	150-170	55°C	
15	G51152	G51152-F G51152-R G51152-INS	5' GCCAGAGTATGCTTTCAC 3' 5' TTCTACAAAACGCCAAG 3' 5' \FAM\CCTTCACCTCAACTTATGG 3'	1 Раунд F+ R	202-230	51°C
			2 Раунд R+INS	182-210	52°C	
16	D6S2443	D6S2443-F D6S2443-R D6S2443-INS	5' CCATACCAAAGTAAAACCCAG 3' 5' GAGGATGAAGGGAAATAGAG 3' 5' \FAM\AAGGTTTGGGATCTCGTTTGT 3'	1 Раунд F+ R	188-208	55°C
			2 Раунд F+ INS	100-130	55°C	

17	D6S2444	D6S2444-F D6S2444-R D6S2444-INS	5' AATACATTCTTTCAGTAAAAATCCAA 3' 5' GAGCCAAGAACCCAGCATTC 3' 5' \HEX\GGGAAGGATTCTAAATAGGGGAG 3'	1 Раунд F+ R	160-170	58°C
				2 Раунд R+INS	140-150	55°C
18	TAP1	TAP1-F TAP1-R TAP1-INS	5' CTGTTTCATATCCTCATAACATCTG 3' 5' TAAGGAGGACAATATTTTGC 3' 5' \FAM\TATTTTGTCTCCTGAGGTATATC 3'	1 Раунд F+ R	235-251	55°C
				2 Раунд F+ INS	205-221	52°C
19	D6S2656 (Ring1)	D6S2656-F D6S2656-R D6S2656-INS	5' GAGGTAATGTCACAGGATGG 3' 5' TGCTTATAGGGAGACTACCG 3' 5' \HEX\CCCTGTGGATGTCAAGAAT 3'	1 Раунд F+ R	223-243	55°C
				2 Раунд R+INS	156-162	55°C
20	D6S1560	D6S1560-F D6S1560-R D6S1560-INS	5' CTCAGTCCCCACTGCCT 3' 5' AATAATGGACATTGTGACTCTGA 3' 5' \FAM\TCCTTGGTGGTAGTGTTCCTAA 3'	1 Раунд F+ R	182-202	60°C
				2 Раунд R+INS	150-160	55°C
21	D6S1583	D6S1583-F D6S1583-R D6S1583-INS	5' TCTGCCCTAACCTGCTTC 3' 5' CTCTGGAAGGCAGATGGC 3' 5' \FAM\CTTAGGTCTCAGGGACAGAC 3'	1 Раунд F+ R	160-180	60°C
				2 Раунд F+ INS	140-160	55°C
22	D6S1629	D6S1629-F D6S1629-R D6S1629-INS	5' AAACGTTGCTGAACCCATAGT 3' 5' ATGCTAGGGAAGGGGTATCTG 3' 5' \HEX\GGAATTCATACACAGTGACTTGAC	1 Раунд F+ R	200-220	56°C
				2 Раунд R+INS	170-190	55°C
23	D6D1568	D6S1568-F D6S1568-R D6S1568-INS	5' AGCTAGGCCAGGCCGTG 3' 5' GAGGAAGGAGTCTGGCTG 3' 5' \HEX\GCCAGTCTACAGATATCCCC 3'	1 Раунд F+ R	160-200	60°C
				2 Раунд F+ INS	120-140	55°C
24	D6S1618	D6S1618-F D6S1618-R D6S1618-INS	5' TTGAGGCCGGAGCACGT 3' 5' CCTAATCTGCGGGTGTTC 3' 5' \HEX\TGGCTGAGCAGTGCAT 3'	1 Раунд F+ R	137-160	56°C
				2 Раунд R+INS	127-150	55°C

Для оценки частоты и распределения рекомбинации внутри области МНС использовался подход, аналогичный предложенному Cullen

с соавт. (2002). Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием метода χ^2 .

Результаты и обсуждение

Была изучена частота и распределение рекомбинационных событий внутри фрагмента размером 5,4 Мб в области 6p21. Исследованный фрагмент, заключенный между маркерами D6S248 и D6S1618, включал МНС (3,3Мб) и фланкирующие его области с теломерной и центромерной стороны. Данные о рекомбинационных событиях в пределах данного фрагмента были собраны в ходе предимплантационного генотипирования blastомеров, полученных от 1896 эмбрионов. Всего было проанализировано 1787 отцовских и 1839 материнских хромосом. В пределах исследованного фрагмента было обнаружено 33 рекомбинации у мужчин и 50 у женщин.

Для изучения распределения рекомбинаций внутри МНС из коллекции микросателлитных маркеров, используемых для HLA генотипирования, были отобраны 24 STR маркера, которые разделили исследуемый фрагмент на 23 сегмента длиной от 30 до 700 т.п.о. (рис.1). Было определено количество рекомбинационных событий, приходящихся на каждый сег-

мент. Каждое наблюдаемое рекомбинационное событие было локализовано между двумя STR маркерами, т.е. определен рекомбинационный интервал. Всего 12 из 83 обнаруженных рекомбинаций были локализованы между двумя соседними STR маркерами, т.е. в пределах одного сегмента; 71 рекомбинационный интервал захватывал два и более соседних сегмента. Для подсчета частоты рекомбинации внутри каждого сегмента мы использовали математическую модель, в которой каждый рекомбинационный интервал был представлен в виде суммы долей, приходящихся на каждый охватываемый сегмент. Для каждого сегмента был определен вклад каждой рекомбинации путем деления наблюдаемого рекомбинационного интервала на количество охваченных сегментов пропорционально размеру каждого сегмента (рис.1). Полученные взвешенные значения числа рекомбинаций, приходящихся на каждый сегмент, были использованы для расчета интенсивности рекомбинации (сМ/Мб). Для обнаружения горячих точек реком-

бинации, полученные взвешенные значения количества рекомбинаций сравнивались с теоретическим значением для каждого сегмента, рассчитанным исходя из гипотезы о том, что рекомбинационные события распределены внутри всего исследованного фрагмента равномерно.

Средняя интенсивность рекомбинации внутри исследованного фрагмента размером 5,4 Мб составила 0,37сМ/Мб для мужчин, 0,53сМ/Мб для женщин и 0,45сМ/Мб для обоих полов. Полученные значения уровня рекомбинации в области МНС в два раза ниже, чем средний уровень рекомбинации для генома человека, который составляет 1сМ/Мб [11]. Низкий уровень рекомбинации в области МНС был подтвержден рядом других исследователей и может быть объяснен высокой степенью полиморфности данной области, затрудняющей синапс гомологичных хромосом во время про-фазы мейоза 1.

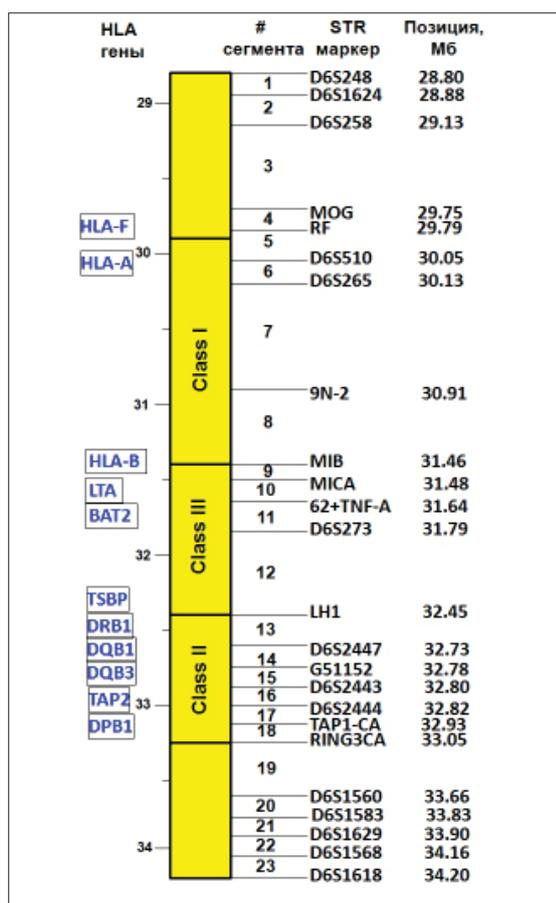


Рис. 1. Позиция и взаимное расположение STR маркеров, использованных для изучения рекомбинации МНС области.

Полученное среднее значение интенсивности рекомбинации для обоих полов 0,45сМ/Мб соответствует значению, рассчитанному на основе популяционных данных (0,44сМ/Мб), что может свидетельствовать в пользу медленной эволюции главного комплекса гистосовместимости, позволяющей сохранять эволюционно благоприятные сочетания HLA аллелей в ряду поколений [12].

Полученное соотношение интенсивности рекомбинации внутри исследуемого фрагмента у мужчин и женщин 1:1.5 соответствует среднему уровню для генома человека. В 1990 годы методом родословных было получено аналогичное соотношение для HLA области 1:4 [13]. Поскольку в последующие годы точные данные относительно частоты рекомбинации у женщин так и не были получены, данное соотношение по-прежнему используется для расчета усредненного значения рекомбинации для обоих полов, в частности при сравнении популяционных данных и результатами анализа спермы, а также для расчета уровня рекомбинации у женщин исходя из среднего популяционного значения.

Была определена средняя интенсивность рекомбинации для каждого из классов главного комплекса гистосовместимости, а также на участках, фланкирующих МНС (рис.2). Было обнаружено неравномерное распределение рекомбинационных событий в области МНС, большинство из которых приходится на область генов класса II и прилегающий к нему центромерный участок. Область HLA генов класса I, а также прилегающий к нему теломерный фрагмент, обнаружили пониженный (0,2 – 0,37 сМ/Мб) уровень рекомбинации, что согласуется с данными, полученными при изучении неравновесия по сцеплению LD (Linkage Disequilibrium), где было показано, что МНС класс I, вместе с прилегающим к нему кластером генов зрительных рецепторов, является одним из самых протяженных LD блоков в геноме человека размером почти 1Мб [14].

Для 9 из 23 сегментов было обнаружено отличие в уровне рекомбинации между мужчинами и женщинами в 2-8 раз, что подтверждает гетерогенность распределения рекомбинаций у мужчин и женщин (рис.3). У женщин для 6, а у мужчин для 4 сегментов было обнаружено

увеличение рекомбинационной активности по сравнению со средним значением в 1.6-5 раз. Три из них, D6S2447-G51152, TAP1-Ring3 и Ring3-D6S1560 находятся в области HLA класса II и соответствуют ранее описанным горячим точкам рекомбинации DQB1-DQB3, DMВ и Ring3-DPB1 (табл.2) [15]. Три оставшиеся сегмента, D6S1583-D6S1629, D6S1629-

D6S1568 и D6S1568-D6S1618 находятся за пределами HLA области и были исследованы впервые. Для сегмента D6S1629-D6S1568 получено статистически значимое увеличение уровня рекомбинации по сравнению со средним, что достоверно указывает на присутствие горячей точки рекомбинации размером 167 т.п.о., ранее не описанной в литературе.

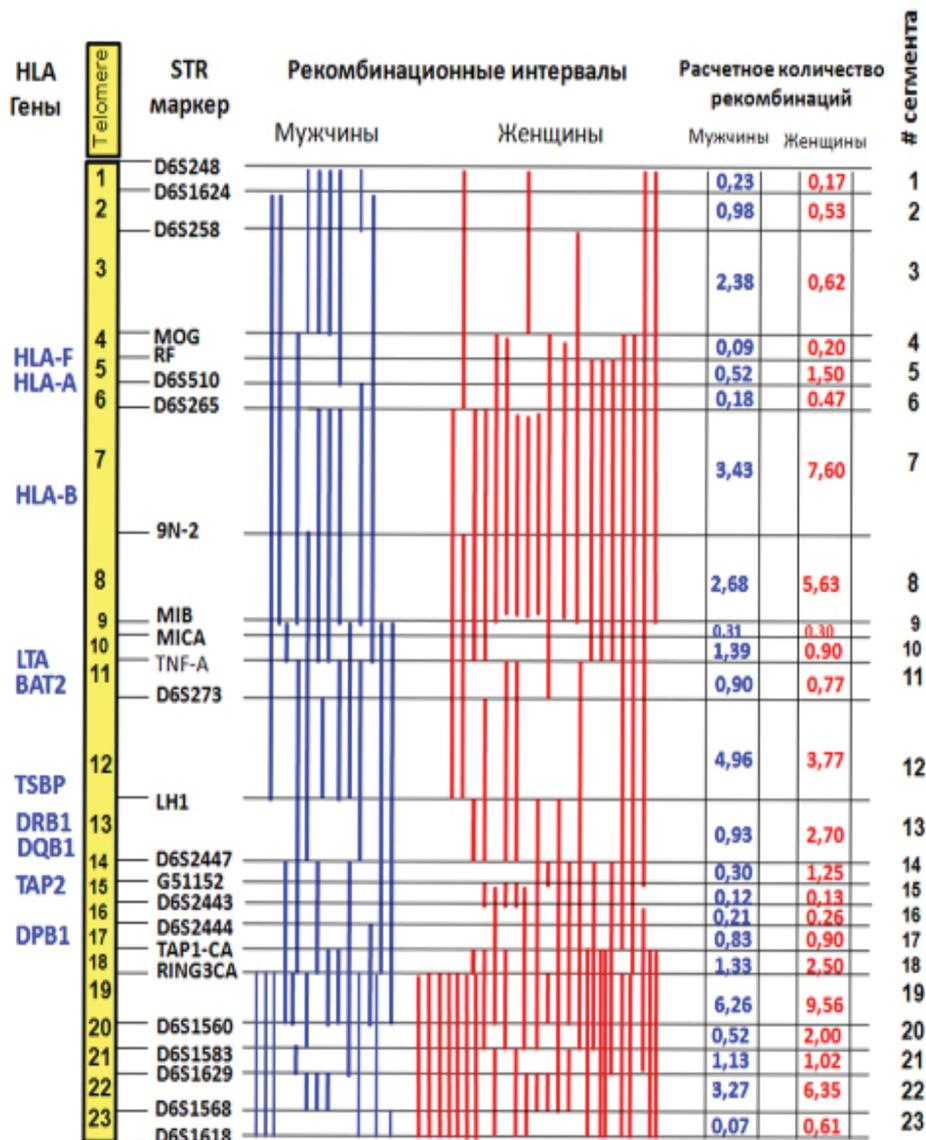


Рис. 2. Карта рекомбинационных событий, обнаруженных внутри исследованного фрагмента размером 5,4 Мб. Синие и красные штрихи отображают рекомбинационные интервалы у мужчин и женщин соответственно.

Таблица 2

Горячие точки рекомбинации, обнаруженные в пределах 5.4Мб фрагмента

№	Сегмент	Позиция, кб	Интенсивность рекомбинации, сМ/Мб			Увеличение интенсивности рекомбинации			Локализация ранее описанных горячих точек	
			Женщины	Мужчины	Среднее значение	Женщины	Мужчины	Среднее значение		
14	D6S2447 – G51152	32,734–32,778	1.50	0.14	0.3862	0.9651	x 2.8	x 1.1	x 2.1	DQB1-DQB3
18	TAP1-CA – Ring3CA	32,927–33,050	1.0637	0.6201	0.8505	x 2	x 1.7	x 1.9	DMB	
19	Ring3CA – D6S1560	33,051–33,662	0.8431	0.5956	0.7241	x 1.6	x 1.6	x 1.6	Ring3-DPB1	
21	D6S1583 – D6S1629	33,795–33,927	1.1135	1.3203	1.2132	x 2.1	x 3.6	x 2.7	-	
22	D6S1629 – D6S1568	33,996–34,063	2.5391	1.4055	1.9931	x 4.8 p<0.05	x 3.8	x 4.4 p<0.05	-	
23	D6S1568 – D6S1618	34,112–34,263	1.9592	0.2464	1.1441	x 3.7	x 0.7	x 2.5	-	

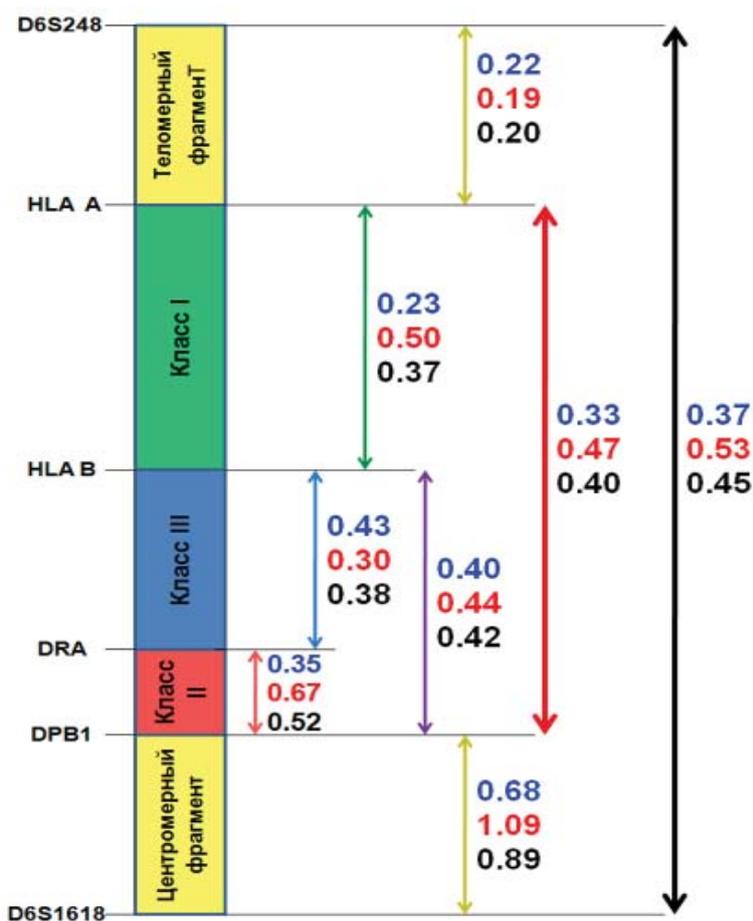


Рис. 3. Рассчитанный уровень рекомбинации для HLA классов I, II и III и прилегающих участков. Синим цветом обозначен уровень рекомбинации у мужчин, красным – у женщин и черным – средний для об

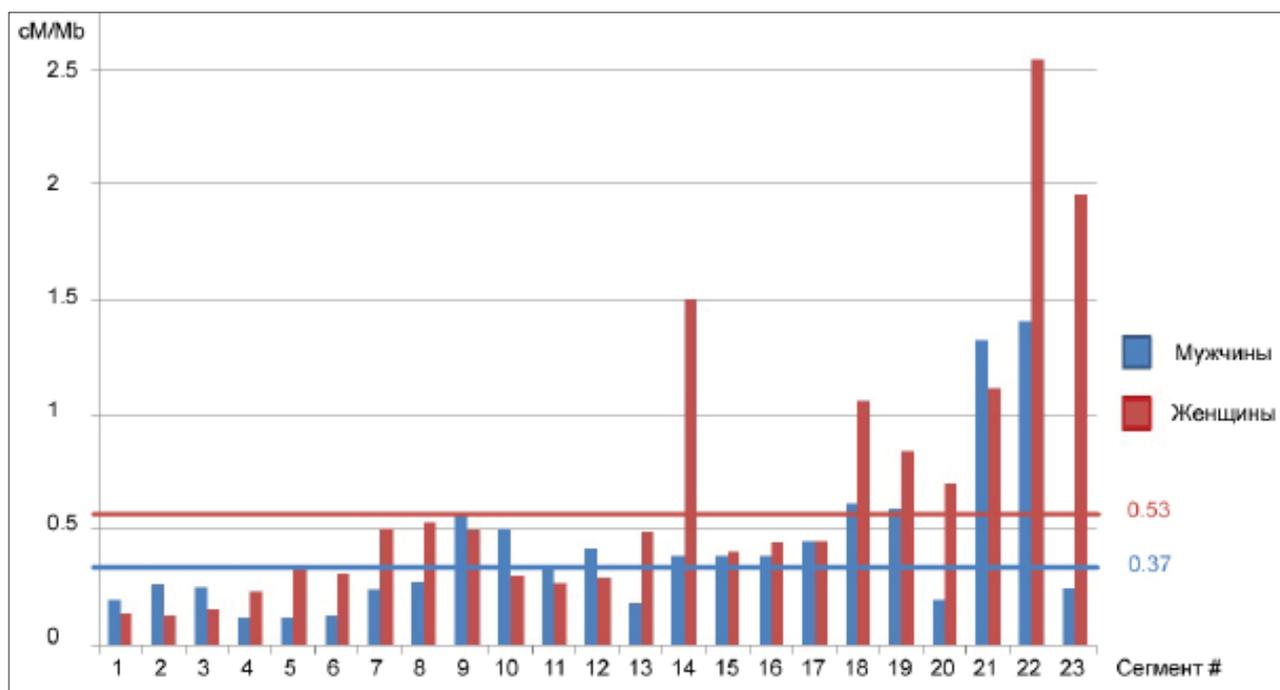


Рис. 4. Распределение уровня рекомбинации у мужчин и женщин для 23 изученных сегментов

Заключение

Впервые на значительной выборке была определена интенсивность рекомбинации в области главного комплекса гистосовместимости и на прилегающих к нему участках генома у женщин, которая составила 0.53сМ/Мб. Интенсивность рекомбинации у мужчин составила 0.37сМ/Мб, что значительно ниже определенной ранее при исследовании спермы. На основе полученных данных впервые рассчитано соотношение уровня рекомбинации в МНС области у мужчин и женщин равное 1:1.5. Данное соотношение может быть использовано для расчета и сравнения усредненного уровня рекомбинации на основе исследования спермы, а также для расчета уровня рекомбинации у женщин, используя популяционные данные для обоих полов. У женщин было обнаружено 6, а у мужчин 4 горячие области рекомбинации, три из которых соответствуют ранее описанным ГТР. Впервые

была исследована рекомбинация на участках, прилегающих к МНС. Увеличение уровня рекомбинации до 2 сМ/Мб достоверно указывает на присутствие горячей точки рекомбинации между маркерами D6S1629 и D6S1568. Необходимы дальнейшие исследования для более точной локализации ГТР внутри данного фрагмента (с разрешением до 2-3 т.п.о.).

Полученные данные по частоте рекомбинации в МНС области не только представляют собой новые данные о рекомбинационных свойствах генома в целом, но и являются важной информацией, незаменимой при отборе маркеров для предимплантационного генотипирования с целью подбора доноров для лечения больного ребенка. Очевидно, что для областей с более высоким уровнем рекомбинации информативность и плотность используемых маркеров должна быть выше, чем для областей с более низкой рекомбинационной активностью.

Список использованных источников

1. Mammalian Meiotic Recombination Hot Spots / N. Arnheim [et al.] // *Annu. Rev. Genet.* – 2007. – Vol.41. – P. 369–399.
2. The distribution and causes of meiotic recombination in the human genome / S. Myers [et al.] // *Biochemical Society Transactions.* – 2006. – Vol.34. – P.526–530.
3. The Fine-Scale Structure of Recombination

Rate Variation in the Human Genome / A. Gilean [et al.] // Science. – 2004. – Vol.304. – P.581-584.

4. Comprehensive Human Genetic Maps: Individual and Sex-Specific Variation in Recombination / K. W. Broman [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1998. – Vol.63. – P.861–869.

5. Justified chauvinism: advances in defining meiotic recombination through sperm typing / M Carrington, M Cullen // Trends in Genetics. – 2004. – Vol.20 (4). – P. 196-205.

6. A Fine-Scale Map of Recombination Rates and Hotspots across the Human Genome / S. Myers [et al.] // Science. – 2005. – Vol.310. – P. 321-324.

7. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases / J. D. Rioux // Proc Natl. Acad. Sci. U S A. – 2009. – Vol.106 (44). – P.18680–18685.

8. High-Resolution Patterns of Meiotic Recombination across the Human Major Histocompatibility Complex / M. Cullen [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2002. – Vol.71. – P.759–776.

9. An evolutionary view of human recombination / G. Coop and M. Przeworski // Nature Reviews/ Genetics. – 2007. – Vol.8. – P. 23-34.

10. Preimplantation Genetic Diagnosis – An Overview / C. M. Ogilvie [et al.] // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 2005. – Vol.53. – P.255–260.

11. A high-resolution recombination map of the human genome / A. Kong [et al.] // Nature Genetics. – 2002. – Vol.31. – P.241-247.

12. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC / P. W. de Bakker // Nature Genetics. – 2006. – Vol.38. – P. 1166-1172.

13. Characterization of recombination in the HLA class II region / M. Cullen [et al.] // Am J Hum Genet. – 1997. – Vol.60 (2). – P. 397-407.

14. A High-Resolution Linkage-Disequilibrium Map of the Human Major Histocompatibility Complex and First Generation of Tag Single-Nucleotide Polymorphisms / M. Miretti [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2005. – Vol.76. – P. 634–646.

15. Where the Crossovers are: Recombination Distributions in Mammals / L. Kauppi [et al.] // Nature Reviews/Genetics. – 2004. – Vol.5. – P. 413-424.

Дата поступления статьи 6 сентября 2010 г.

ВНУТРИПОРОДНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ БЕЛОРУССКОГО РАЗВЕДЕНИЯ ПО ПОЛИМОРФНЫМ ВАРИАНТАМ ГЕНОВ СОМАТОТРОПИНОВОГО КАСКАДА

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

Введение

Одним из основных приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь является получение сельскохозяйственных животных, обладающих повышенной молочной продуктивностью и исследование генетических, физиологических и биохимических механизмов формирования продуктивности [1, 2]. Эффективная реализация селекционных программ в настоящее время требует привлечения современных методов молекулярных исследований. Одним из новейших селекционных направлений является маркер-сопутствующая селекция (marker assisted selection (MAS)), сочетающая информацию о полиморфных вариантах генов, отвечающих за развитие качественных признаков, с данными об их фенотипическом проявлении. В этой связи значительный интерес представляют гены соматотропинового каскада, так как гормон роста (соматотропин) является центральным регулятором роста и лактации у млекопитающих, а гормоны, опосредующие его воздействия на ткани-мишени, влияют на внутриклеточный белковый, углеводный и липидный метаболические обмены. На сегодняшний момент у представителей различных пород крупного рогатого скота для каждого из генов соматотропинового каскада выявлен широкий спектр полиморфных вариантов, в том числе и обусловленных онднуклеотидными заменами. Однако, эти данные носят фрагментативный, а

иногда и противоречивый характер. Поэтому нами сделана попытка провести комплексное исследование ассоциации генов-кандидатов соматотропинового ряда с количественными признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота.

Так как изучаемые полиморфизмы генов соматотропинового каскада встречаются редко и частота их по данным других исследователей различна не только у представителей разных пород, но и в пределах одной породы, то целью первого этапа работы был анализ генетической структуры популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения.

Нами исследованы *HinFI*- и *StuI*-полиморфизмы гена гипофизарного фактора-1 *bPit-1*, запускающего экспрессию гена гормона роста [3, 4]; *RsaI*-полиморфизм гена пролактина *bPrl*, белковый продукт которого является гуморальным регулятором лактации [5]; *AluI*-полиморфизм гена гормона роста *bGH* одного из ключевых регуляторов роста и лактации у млекопитающих [6]; *SspI*-полиморфизм гена рецептора гормона роста *bGHR*, белок которого осуществляет передачу гуморального сигнала гормона роста к клеткам-мишеням [7]; и *SnaBI*-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста-1 *bIGF-1*, запускающего внутриклеточные метаболические ответы на воздействие соматотропина [8].

Материалы и методы

Объект исследования – выборки из популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения.

Материалом для исследования послужили 329 образцов ДНК, выделенных из крови коров черно-пестрой породы, предоставленных

животноводческими предприятиями Минской области. Источником информации о молочной продуктивности послужили племенные карты исследуемых животных.

Относительные частоты аллелей исследуемых генов определяли методом прямого подсчета по формуле:

$$P_{(A)} = (2N_1 + N_2) / 2n$$

где N_1 - число гомозигот по исследуемому аллелю;

N_2 - число гетерозигот;

n - объем выборки [9].

Статистическую ошибку относительных частот аллелей генов вычисляли по формуле [10]:

$$S_p = (\sqrt{pq}) / n$$

где p - частота исследуемого аллеля;

$$q = 1 - p$$

n - объем выборки

Сравнение выборок по распределению абсолютных частот аллельных вариантов ис-

следуемых генов проводили с помощью критерия χ^2 по Пирсону. Число степеней свободы равно единице.

Соответствие фактического распределения генотипов теоретически ожидаемому оценивали с помощью критерия χ^2 . Число степеней свободы равняется числу генотипов минус число аллелей.

$$\chi^2 = \sum (H_o - H_e) / H_e$$

где H_o - наблюдаемые частоты генотипов

H_e - ожидаемые частоты генотипов:

$$AA = p^2;$$

$$AB = 2pq;$$

$$BB = q^2 [11].$$

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 таблице 1.

Таблица 1

Индивидуальные характеристики условий ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов соматотропинового каскада

Полиморфизм	Условия амплификации	Последовательности праймеров
<i>bPit-1-HinfI</i> [3]	94°C-1 мин; (95°C-45с; 56°C-60с; 72°C-60с)х35; 72°C-10мин	<i>HinfI</i> -F: 5'-aaaccatcatctcccctctt-3'
		<i>HinfI</i> -R: 5'-aatgtacaatgtgcctctgag-3'
<i>bPit-1-StuI</i> [4]	95°C-5 мин; (95°C-45с; 55°C-45с; 72°C-45с)х35; 72°C-10мин	<i>StuI</i> -F: 5'-caaatggctctttctgtgttacaggg-3'
		<i>StuI</i> -R: 5'-ctttaaactcattggcaaacctttc - 3'
<i>bPrl-RsaI</i> [5]	95°C-5 мин; (95°C-30с; 63°C-30с; 72°C-30с)х30; 72-10мин	<i>RsaI</i> -F: 5'-gcctccagaagtcgtttgttttc-3'
		<i>RsaI</i> -R: 5'-cgagtccttatgagcttgattctt-3'
<i>bGH-AluI</i> [6]	95°C-5 мин; (95°C-30с; 64°C-30с; 72°C-60с)х30; 72°C-10 мин	<i>AluI</i> -F: 5'-ccgtgtctatgagaagc -3'
		<i>AluI</i> -R: 5'-gttcttgagcagcgcgct -3'
<i>bGHR-SspI</i> [7]	95°C-5 мин; (95°C-30с; 60°C-30с; 72°C-30с)х30; 72°C-10 мин	<i>SspI</i> -F: 5'-aatactgggctagcagtgacaatat-3'
		<i>SspI</i> -R: 5'-acgtttcactgggttgatga-3'
<i>bIGF-1-SnaBI</i> [8]	95°C-5 мин; (95°C-30с; 64°C-30с; 72°C-30с)х35; 72°C-10 мин	<i>SnaBI</i> -F: 5'-attacaaagctgcctgcccc-3'
		<i>SnaBI</i> -R: 5'-accttaccctgatgaaaggaact-3'

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

Таблица 2

Схемы ПДРФ-анализа продуктов амплификации исследуемых полиморфных участков генов соматотропинового каскада

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

Результаты и обсуждение

Результаты исследования относительных частот аллельных вариантов генов соматотропинового каскада у животных черно-

пестрой породы разводимых на разных предприятиях Республики Беларусь представлены в таблице 3.

Таблица 3

Распределение относительных частот аллелей исследуемых генов в популяции черно-пестрого скота ($P \pm m_p$)

Название полиморфизма	Аллель	Относительная частота аллеля \pm статистическая ошибка		
		РУСП «Племенной завод Красная звезда»	СПК АК «Снов»	Минская птицефабрика №1
<i>bPit-1-HinF1</i>	<i>bPit-1-HinF1^A</i>	0,368\pm0,012	0,212\pm0,002	0,179\pm0,003
	<i>bPit-1-HinF1^B</i>	0,632 \pm 0,012	0,788 \pm 0,002	0,821 \pm 0,003
<i>bPit-1-StuI</i>	<i>bPit-1StuI^A</i>	0,013\pm0,003	0,118\pm0,002	0,174\pm0,003
	<i>bPit-1StuI^C</i>	0,987 \pm 0,003	0,882 \pm 0,002	0,826 \pm 0,003
<i>bPrl-RsaI</i>	<i>bPrl-RsaI^A</i>	0,882 \pm 0,008	0,893 \pm 0,002	0,853 \pm 0,003
	<i>bPrl-RsaI^B</i>	0,118\pm0,008	0,107\pm0,002	0,147\pm0,003
<i>bGH-AluI</i>	<i>bGH-AluI^L</i>	0,829 \pm 0,009	0,874 \pm 0,002	0,243 \pm 0,003
	<i>bGH-AluI^V</i>	0,171\pm0,009	0,126\pm0,002	0,757\pm0,003
<i>bGHR- SspI</i>	<i>bGHR-SspI^F</i>	0,711 \pm 0,012	0,777 \pm 0,002	0,798 \pm 0,003
	<i>bGHR-SspI^Y</i>	0,289\pm0,012	0,223\pm0,002	0,202\pm0,003
<i>bIGF-1- SnaBI</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^A</i>	0,566 \pm 0,01	0,599 \pm 0,002	0,537 \pm 0,004
	<i>bIGF-1-SnaBI^B</i>	0,434\pm0,01	0,401\pm0,002	0,463\pm0,004

В дальнейшем было проведено сравнение полученных относительных частот аллельных вариантов среди животных разных выборок. Выборки трех предприятий сравнивались попарно:

1. РУСП «Племенной завод Красная звезда» - СПК АК «Снов»;
2. РУСП «Племенной завод Красная звезда»

- Минская птицефабрика №1;

3. СПК АК «Снов» - Минская птицефабрика №1.

Данные по результатам сравнения относительных частот аллельных вариантов исследуемых генов в разных популяциях коров черно-пестрой породы представлены в таблице 4.

Таблица 4

Сравнение распределения абсолютных частот аллелей генов соматотропинового каскада в популяциях черно-пестрого скота*

Название полиморфизма	РУСП «Племенной завод Красная звезда»/ СПК АК «Снов»		РУСП «Племенной завод Красная звезда»/ Минская птицефабрика №1		СПК АК «Снов» / Минская птицефабрика №1	
	χ^2	p*	χ^2	p*	χ^2	p*
<i>bPit-1-HinF1</i>	8,52	0,003	11,50	0,001	0,91	0,340
<i>bPit-1-StuI</i>		0,002**		0,000**	3,59	0,058
<i>bPrl-RsaI</i>		0,452**		0,343**	2,00	0,157
<i>bGH-AluI</i>	1,08	0,298	80,69	0,000	234,53	0,000
<i>bGHR- SspI</i>	1,57	0,210	2,49	0,115	0,35	0,556
<i>bIGF-1- SnaBI</i>	0,29	0,593	0,19	0,661	2,16	0,14

*- Полученные данные рассматривались как статистически значимые при уровне значимости $P < 0,05$.

** - Значения p рассчитаны с помощью точного критерия Фишера, двусторонний тест.

Анализ распределения относительных частот полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада в разных популяциях выявил статистически значимые отличия для гена гипофизарного фактора роста-1 *bPit-1* по обоим исследуемым полиморфизмам (*bPit-1-HinF1* и *bPit-1-StuI*) в группе животных предприятия «Племенной завод Красная звезда» (табл. 3, 4). Из исследуемой выборки этого предприятия выяснилось, что относительная частота редкого аллеля *bPit-1-HinF1^A* выше, чем в популяциях предприятий «Снов» и «Минская птицефабрика № 1» (табл. 3). Причем по отношению к популяции предприятия «Снов» в популяции животных «Племенной завод Красная звезда» частота этого редкого аллеля выше в 1,7 раза, а по отношению к популяции «Минская птицефабрика №1» – в 2 раза (табл. 3).

Исследование распределения относительных частот *StuI*-полиморфных аллелей гена *bPit-1* выявило статистически значимые отличия также для выборки популяции животных предприятия «Племенной завод Красная звезда» (табл. 4). Но по данному полиморфизму относительная частота редкого аллеля *bPit-1StuI^A* в популяции этого предприятия оказалась ниже по отношению к двум другим выборкам. Так, относительная частота аллеля *bPit-1StuI^A* в популяции предприятия «Племенной завод Красная звезда» была в 9 раз ниже по сравнению с выборкой из популяции предприятия «Снов» и в 13,4 раза ниже по сравнению с выборкой предприятия «Минская птицефабрика № 1» (табл. 3).

Исследование распределения относительных частот *AluI*-полиморфных аллелей гена гормона роста *bGH* выявило статистически

значимое отличие по этому показателю для выборки животных предприятия «Минская птицефабрика №1» по отношению к двум другим (табл. 4). Необходимо отметить, что практически все гомозиготные по аллелю *bGH-AluI^V* животные (70 из 74-х) черно-пестрой породы были выявлены в выборке из популяции этого предприятия. Относительная частота редкого аллеля *bGH-AluI^V* среди животных этой группы значительно превышала таковую в выборках из популяций двух других предприятий. Превышение составило 4,4 раза по отношению к выборке предприятия «Племенной завод Красная звезда» и 6 раз по отношению к выборке предприятия «Снов» (табл. 3).

Полученные данные демонстрируют высокую внутривидовую гетерогенность среди популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения по локусам генов гипофизарного фактора *bPit-1* (полиморфизмы *bPit-1-StuI* и *Pit-1-HinF1*) и гена гормона роста *bGH* (полиморфизм *bGH-AluI*). Наблюдаемое явление может быть связано с особенностями ведения селекционной работы на данных предприятиях.

Нами отмечено, что для каждой пары аллелей каждого из исследуемых генов аллель, являющийся редким в одной группе, оказывался редким во всех остальных популяциях.

Также нами было проанализировано соответствие распределения генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга для исследуемых генов соматотропинового каскада среди животных черно-пестрой породы. Анализ соответствия проводился с помощью критерия χ^2 . Полученные данные представлены в таблице 5.

Таблица 5

Анализ соответствия распределения частот генотипов в белорусских популяциях голштинского и черно-пестрого крупного рогатого скота по генам соматотропинового каскада теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга

Название полиморфизма	Генотип	РУСП «Племенной завод Красная звезда» n=38		СПК АК «Снов» n=182		Минская птицефабрика №1 n=109	
		n	χ^2	n	χ^2	n	χ^2
<i>bPit-1-HinF1</i>	<i>bPit-1-HinF1^{AA}</i>	7	1,65	6	0,91	1	1,81*
	<i>bPit-1-HinF1^{AB}</i>	14		65		37	
	<i>bPit-1-HinF1^{BB}</i>	17		111		71	
<i>bPit-1-StuI</i>	<i>bPit-1StuI^{AA}</i>	0	37,25*	0	2,22*	0	3,69*
	<i>bPit-1StuI^{AC}</i>	1		43		38	
	<i>bPit-1StuI^{CC}</i>	37		139		71	
<i>bPrl-RsaI</i>	<i>bPrl-RsaI^{AA}</i>	29	0,04*	145	0,08*	78	0,49*
	<i>bPrl-RsaI^{AB}</i>	9		35		30	
	<i>bPrl-RsaI^{BB}</i>	0		2		1	
<i>bGH-AluI</i>	<i>bGH-AluI^{LL}</i>	25	0,63*	140	0,19*	14	15,47
	<i>bGH-AluI^{LV}</i>	13		38		25	
	<i>bGH-AluI^{VV}</i>	0		4		70	
<i>bGHR-SspI</i>	<i>bGHR-SspI^{FF}</i>	19	0,04*	111	0,18	68	0,37*
	<i>bGHR-SspI^{FY}</i>	16		61		38	
	<i>bGHR-SspI^{YY}</i>	3		10		3	
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	14	1,47	68	0,70	34	1,01
	<i>bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	15		82		49	
	<i>bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	9					

*-значения χ^2 рассчитаны с поправкой Йетса. Значение χ^2 для уровня значимости 0,05 составляет 3, 84.

Нами выявлено, что среди выборки животных предприятия «Племенной завод Красная звезда» наблюдается отклонение наблюдаемого распределения частот генотипов от теоретически ожидаемого равновесного распределения Харди-Вайнберга по *bPit-1 StuI*-полиморфизму. Ранее отмечено, что относительные частоты аллельных вариантов гена *bPit-1* по этому полиморфизму статистически значимо отличаются от таковых в выборках других популяций (табл. 3, 4).

По *HinF1*-полиморфизму в выборке животных «Племенной завод Красная звезда» также выявлено отличие относительных частот аллельных вариантов гена *bPit-1*, а наблюдаемое распределение частот генотипов по этому

полиморфизму соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

Отмечаемое в популяции коров предприятия «Минская птицефабрика №1» отличие распределения относительных частот *AluI*-аллельных вариантов гена гормона роста *bGH* (табл. 3, 4) от двух других популяций сопровождается отклонением наблюдаемого распределения частот генотипов от теоретически ожидаемого равновесного распределения Харди-Вайнберга.

По другим полиморфизмам исследуемых генов наблюдаемое распределение частот генотипов соответствовало теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

Заключение

Нами исследованы относительные частоты встречаемости полиморфных вариантов пяти генов соматотропинового каскада в трех различных популяциях крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения. А именно, *bPit-1-HinF1* и *bPit-1-StuI*-полиморфизмы гена гипофизарного фактора роста-1, *bPRL-RsaI* полиморфизм гена пролактина, *bGH-AluI*-полиморфизм гена гормона роста и *IGF-1-SnaBI*-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста-1.

Выявлено, что в парах аллельных вариантов каждого из исследуемых генов, редкий аллель совпадал в выборках всех трех популяций.

Т.е., ситуации, когда аллель, являющийся редким в одной выборке, оказался бы более распространенным в другой выборке, нами отмечено не было.

Внутрипородные различия распределения относительных частот аллельных вариантов были выявлены для гена гипофизарного фактора *bPit-1* по *HinF1*- и *bPit-1-StuI*-полиморфизмам, а также для *AluI*-полиморфизма гена гормона роста *bGH*.

Отклонения распределения частот генотипов от теоретически ожидаемого равновесного распределения Харди-Вайнберга наблюдается только по тем полиморфизмам и в тех же выборках, по которым отмечены внутрипородные отличия распределения относительных частот аллельных вариантов.

Выявленные тенденции в дальнейшем будут учтены при исследовании ассоциации полиморфизмов генов соматотропинового каскада с признаками молочной продуктивности у коров голштинской и черно-пестрой пород.

Список использованных источников

1. Структура приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2006–2010 годы, утверждена Указом Президента Республики Беларусь № 315 от 06.07.2005.
2. Перечень приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 гг., утвержденный постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 17 мая 2005 г. № 512.
3. Edriss, V., Edriss, V.a., Rahmani, H. R. Pit-1 Gene polymorphism of Holstein Cows in Isfahan Province. *iotechnology* 7 (2): 209–2126 2008.
4. Huang W. A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in dairy cattle. / W. Huang, C. Maltecca and H. Khatib. // *Animal Genetics*. – 2008. – Vol. 39. – P. 554–557.
5. Alipanah, M. Kappa-Casein and PRL-RSA I Genotypic Frequencies in two russian cattle breeds / M. Alipanah, L. A. Kalashnikova, G. V. Rodionov // *Archivos Zootec*. – 2008. – Vol. 57, № 218. – P. 131–138.
6. Zhou, G L, Liu, H G, Liu C, Guo, S L, Zhu, Q and Wu, Y H. 2005. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *Journal of Biosciences* 30: 595.
7. Viitala, S., Szyda, J., Bloot, S., Schulman, N., Lidauer, M., Mäki-Tanila, A., Georges, M., Vilkki, J.H., 2006. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire cattle. *Genetics* 173: 2151–2164.
8. Siadkowska, E. L. Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle / E. L. Siadkowska // *Animal Science Papers and Reports*. – 2006. – Vol. 24, № 3. – P. 225–237.
9. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях. / М.: Наука, – 1989.
10. Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов // Минск: БГУ, –1961.
11. Рокицкий, П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов // Минск: БГУ. 1961.
12. Айала, Ф., Кайгер, Дж., Современная генетика. Т 3., М.: Мир, 1988. – 335 с.

Дата поступления статьи 22 сентября 2010 г.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ *BISON BONASUS* LINNAEUS, ПОЛУЧЕННАЯ ПРИ СРАВНЕНИИ ДВУХ МЕТОДОВ ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА: ISSR-ФИНГЕРПРИНТИНГА И RAPD-АНАЛИЗА

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²Институт общей генетики им. Н.В.Вавилова РАН
РФ, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

Введение

Изучение современного состояния популяций различных видов животных и растений является важным этапом для сохранения биоразнообразия. Особенно остро это касается популяций редких и исчезающих, а также искусственно восстановленных видов, так как для их сохранения и обеспечения стабильного существования в природе необходимо не просто проводить учеты численности и составлять описание их морфологических характеристик, но и осуществлять обширные комплексные исследования взаимозависимости и влияния различных факторов на физическое развитие и общее состояние особей в популяциях. Такой подход имеет первостепенное значение для составления прогноза возможного развития и существования популяций в природе, а также дает возможность своевременно реагировать на изменения, которые со временем могут привести к сокращению численности или полному исчезновению вида.

Совсем недавно на положении редкого и находящегося под угрозой исчезновения вида был зубр (*Bison bonasus* Linnaeus). Его формирование как вида произошло в голоцене. В историческое время ареал зубра занимал обширные зоны широколиственных и смешанных лесов Европы (кроме стран, расположенных на ее северной части), Кавказа, Закавказья и Северного Ирана. *Bison bonasus* подразделяется на 3 подвида: *Bison b. bonasus* Linnaeus – беловежский, или литовский зубр; *B. b. caucasicus* Satunin – кавказский зубр и *B. b. hungarorum* Kretzoi – трансильванско-карпатский горный зубр. Последний вымер около 1790 г. Из доживших до наших дней подвидов зубра

только беловежский (или равнинный) сохранился в чистом виде. Кавказский подвид был истреблен в XX веке и ныне представлен гибридами с *Bison b. bonasus* и *Bison bison* разной степени кровности /1/.

Таким образом, белорусское поголовье зубров произошло от 5 животных-основателей, находящихся в тесном кровном родстве. Это объясняет тот факт, что в первые годы разведения из-за близкородственного скрещивания потомки этих зубров практически все умирали в раннем возрасте. Чтобы оздоровить генетически обедненную популяцию, в 1949 году в белорусский зубропитомник была завезена еще одна группа зубров беловежской линии (5 особей), но уже плесского происхождения /2, 4/. Эта ветвь ведет свое начало от группы зубров, которая в 1865 году была вывезена в Пшину, имение князя Плес, и долгое время разводилась сама по себе. Поэтому ее потомки характеризуются в некоторой степени вырожденными признаками: гораздо меньшими размерами, утонченным костяком, более светлой окраской /3/. Но, тем не менее, прилив «свежей крови» плесских зубров обеспечил лучшую выживаемость беловежского молодняка. Следует особо отметить следующее: при анализе распределения генетического пула родоначальников в современных зубрах было выявлено, что основатели Плесской ветви беловежской линии внесли наибольший вклад в генетическую структуру вольноживущих популяций зубра (больше половины, для некоторых групп больше 90 %) /5/. После двух советско-польских конференций по проблемам зубра (в 1961 и 1963 гг.) было решено

объявить всю Беловежскую Пущу местом разведения чистокровных беловежских зубров, а всех поместных животных этого вида вывести в другие регионы для расселения. Оставшееся беловежское стадо было пополнено 38-ью чистокровными беловежскими зубрами из Приокско-Тerrasного заповедника /6/.

Итак, за всю историю своего существования не только на территории Беларуси, но и в мире зубр как вид несколько раз проходил стадию «бутылочного горлышка». Этот факт, а также происхождение мировой популяции зубров всего от 12 животных-основателей не оставляют сомнений в крайней обедненности генофонда этого вида. Тесное родство внутри групп и продолжительное разведение в условиях зубропитомников, зоосадов и зоопарков, ведущее к близкородственному скрещиванию, не могли не оказать влияния на здоровье и жизнеспособность зубров. Исторически сложилось, что разведение зубра ведется по трем линиям: беловежской, беловежско-кавказской и горной, получившей статус подвида /7/. Анализ витальных характеристик зубров разных линий показал недостоверное ухудшение параметров жизнеспособности и плодовитости мировой популяции животных данного вида /5/. В генотипах современных зубров всех линий разведения очень хаотично и неполно представлен генетический пул родоначальников.

Негативно сказывается на полиморфизме и неравномерное участие самцов в репродукции. В силу своего происхождения от малочисленного числа животных-основателей и, следовательно, высокой степени инбридинга (коэффициент инбридинга мировой популяции равен 0,324), беловежская линия зубров, по сравнению с остальными, имеет наиболее низкий уровень генетического разнообразия. Горная линия зубров находится в более выигрышном положении в отношении внутривидового полиморфизма, так как в родословных этих животных присутствуют бизоны (доля крови, в среднем, составляет 5,6 %). Кавказско-беловежская линия, ведущая свое происхождение от 12 родоначальников (коэффициент инбридинга равен 0,193), занимает промежуточное положение. Проведенный анализ генетических расстояний между субпопуляциями одной линии разведения и субпопуля-

циями разных линий показал, что их величины сравнимы с таковыми для отдельных стад одной породы крупного рогатого скота, т.е. межпопуляционная генетическая дифференциация зубров невелика. Беловежская линия генетически близка к кавказско-беловежской и может рассматриваться как часть последней. Горные зубры хоть и несколько обособлены, но также генетически близки к остальным популяциям /5/.

Низкий уровень полиморфизма в популяциях зубров негативно сказывается на общем физическом развитии животных, их выживаемости, плодовитости и стабильности существования популяции на воле. Различного рода поражения желудочно-кишечного тракта и половых органов, новообразования, мертворождение, потеря слуха и зрения, отставание в росте, рахит, дерматоз, авитаминоз, агрессивность к людям – это лишь немногие проявления постепенного вырождения в существующих популяциях зубра. Отсутствие необходимого генетического разнообразия обуславливает возросший на сегодняшний день процент ослабленных и больных животных данного вида.

Бичом современного мирового поголовья зубров является заболевание мочеполовых органов у самцов. Ежегодная селекционная выбраковка, разрешенная в нашей стране с 1985 г., позволила опровергнуть ранее бытовавшее мнение, что повреждения мочеполовых органов у самцов вызваны случайными травмами. Болезнь была определена как гнойно-некротический баланопостит. Участившиеся в последние 20 лет случаи его проявления являются, главным образом, последствием близкородственных скрещиваний /4, 8, 9/.

Таким образом, для оздоровления популяции беловежского зубра необходимо проводить генетико-селекционные исследования с целью подбора более удаленных пар для уменьшения инбридинга и увеличения гетерогенности в микропопуляциях, которых на сегодняшний день на территории Беларуси существует 9 (перечислены по времени их создания): беловежская, березинско-борисовская, припятская, воложинская, полесская, осиповичская, озерская, ляско-вичская, бриневская (найденская). С 1991 по

2010 гг. зубровое поголовье на всей территории Беларуси увеличилось с 353 до 800 особей.

Теперь Беларусь занимает 2-е место в мире (после Польши) по численности зубра /10/.

Материалы и методы исследований

Объект исследования – выборки особей из микропопуляций беловежского зубра (*Bison bonasus* Linnaeus), отобранные в разное время.

Первая выборка из популяции зубра на территории Беларуси была собрана с 1980-1990 гг. и была любезно представлена д.б.н. Сулимовой Г.Е., Институт общей генетики им. Н.В.Вавилова РАН. Выборка включает 13 особей беловежского зубра (Беларусь), 9 особей кавказского зубра и 3 особи бизона (Приокско-Террасный заповедник, Россия).

Вторая современная выборка из микропопуляций беловежского зубра – за период 2005-2009 гг. Эта выборка включает 17 особей из разных микропопуляций Беларуси.

В наших исследованиях использовались следующие молекулярно-генетических методы:

1) метод RAPD анализа для оценки полиморфизма локусов анонимных последовательностей ДНК зубра с помощью высоко-

кополиморфных ДНК-маркеров (маркеры RAPD-PCR) /11/;

2) метод ISSR-анализа полиморфизма локусов известных последовательностей межмикросателлитных повторов (маркеры ISSR-PCR) /12-13/.

Преимущества выбранных нами методов:

- с помощью молекулярных RAPD- и ISSR-маркеров можно выявить полиморфизм на уровне ДНК;

- данные маркеры не находятся под действием окружающей среды и могут применяться на всех стадиях развития животных;

- два типа маркеров, используемые нами, имеют как известную нуклеотидную последовательность (ISSR-анализ), так и с произвольную (RAPD-анализ).

Нами были проведены лабораторные исследования ряда произвольных праймеров для RAPD- анализа и выбраны оптимальные условия условия проведения полимеразной цепной реакции. (ПЦР) (табл.1).

Таблица 1

RAPD-праймеры и режимы полимеразной цепной реакции

Метод	Название и последовательность праймеров	Режимы проведения полимеразной цепной реакции (режим ПЦР)
RAPD-анализ	UBC-85: 5'-gtg ctc gtg c-3', 70% GC; UBC-126: 5'-ctt tcg tgc t-3', 50% GC;	5 циклов: денатурация - 60 сек при 92° C отжиг 60 сек при 35° C, 150 сек при 72° C, 35 циклов - 60 сек при 92° C; 60 сек при 42° C, Элонгация 150 сек при 72° C.
RAPD-анализ	OPAA-19: 5'-tga ggc gtc t-3; OPAD-12: 5'aag agg gcg t-3';	5 циклов: денатур -60 сек при 92° C отжиг 60 сек при 35° C, 150 сек при 72° C, 35 циклов- 60 сек при 92° C 60 сек при 42° C, Элонгация 150 сек при 72° C.
RAPD-анализ	три десятичных праймера П29- 5- ccg gcc tta c-3 П45 5- gcc gtc- cga g - 3 П17 – 5 – gac gcg ttg t- 3	Денатурация - 60 сек при 94° C затем 35 циклов: 94°С – 1 мин, 40°С – 1 ми, 72°С – 2 мин элонгация 72° C – 10 мин.

RAPD-анализ	П1: 5-gtc gac gca t-3 П2: 5-tct gaa acg tg-3 П3: 3-tgg tgc tga ga-3 П4: 5-cca cga cga t-3	денатурация – 1 мин при 94° С, отжиг 2 мин при 37° С. полимеризация – 2 мин при 72° С в течение 40 циклов. В последнем цикле стадия полимеризации продолжалась 10 мин при 72° С.
-------------	--	---

Мы предлагаем повысить степень разрешения *RAPD*-метода с помощью замены агарозного геля на акриламидный, а также адаптировать условия проведения амплификации за счет подбора концентрации ионов магния и условий проведения полимеразной цепной реакции (условия ПЦР-реакции).

Для визуализации продуктов амплификации в *RAPD*-анализе проводят агарозный или акри-

ламидный гель-электрофорез с дальнейшим окрашиванием геля бромистым этидием. Этот метод используется для ряда целей, включая филогенетические исследования видов, подвидов диких животных.

Для *ISSR*-анализа были взяты следующие праймеры: (AG)₉C и (GA)₉C и подобраны следующие условия амплификации (табл.2).

Таблица 2

ISSR-праймеры и режимы полимеразной цепной реакции

Метод	Название и последовательность праймеров	Режимы проведения полимеразной цепной реакции (режим ПЦР)
ISSR	(AG) ₉ C 5-AGAGAGAGAGAGAGAGAGC-3 (GA) ₉ C 5-GAGAGAGAGAGAGAGAGAC-3	5 циклов: денатур -60 сек при 92° С отжиг 60 сек при 35° С, 150 сек при 72° С, 35 циклов- 60 сек при 92° С 60 сек при 42° С, Элонгация 150 сек при 72°С

Маркеры *RAPD* и *ISSR* относятся к маркерам доминантного типа наследования (наличие/отсутствие полосы в ДНК-паттерне).

Результаты исследования

Проведено сравнение результатов, полученных при исследовании двух *ISSR*- и десяти *RAPD*- праймеров. Праймеры (GA)₉C и ОРА-20 не выявляли полиморфизма в исследованных образцах *B. bonasus*, однако праймер ОРА-20 выявлял один локус, характерный для *B. taurus*, но не встречающийся в исследованных образцах *B. bonasus*, из чего был сделан вывод, что данный маркер является видоспецифичным, и может быть использован для выявления гибридизации и уровня интрогрессии между *B. bonasus* и *B. taurus*. /20, 25, 26/.

Характеристики праймеров, выявлявших полиморфизм, представлены в табл.3. Следует отметить, что мы сравниваем данные по всем выборкам (1980-1990 гг. и 2005-2009 гг). Как видно из данной таблицы, лишь один *ISSR*-праймер может быть использован для изучения генетической структуры популяций беловежского зубра. При этом с его помощью можно различить не более $2^4 = 16$ особей, что совершенно недостаточно, поэтому данный праймер имеет смысл использовать как вспомогательный.

Таблица 3

Генетико-популяционные показатели, выявленные с помощью RAPD- и ISSR- анализа генетической структуры популяции беловежского зубра (*B. Bonasus*)

Название праймера	Мах. число выявляемых полос	Min. число выявляемых полос	Среднее число полос	Молекулярная масса	Количество выявляемых локусов		Уровень полиморфизма (%)
					всего	полиморфных	
RAPD-праймеры							
OPA-01	17	9	11,4	250-3000	19	14	73,7
OPA-02	11	8	9,5	200-2000	13	8	61,5
OPA-03	12	7	9,8	300-3000	15	11	73,3
OPA-04	10	6	7,8	160-2000	12	9	75
OPA-05	12	8	9,6	280-2000	13	9	69,2
OPA-08	18	9	12,8	120-2000	19	13	68,4
OPA-18	9	7	8	600-3000	12	7	58,3
OPA-19	12	7	8,3	500-3000	13	8	61,5
OPB-08	16	14	15	380-2000	17	11	64,7
среднее значение:	11,9	9,4	10,2	-----	14,8	10,0	67,3
ISSR-праймеры							
(AG) ₉ C	8	3	3,84	100-3000	9	4	42,0

Из 10-ти RAPD-праймеров 9 оказались пригодными для изучения генетической структуры популяций беловежского зубра. Всего было выявлено 133 RAPD-локуса, из них – 90 полиморфных.

Каждый праймер выявлял от 12 (OPA-18 и OPA-04) до 19 (OPA-01 и OPA-08) локусов, при этом у каждой отдельной особи от 6 (OPA-08) до 18 (OPA-08) локусов находились в доминантном состоянии. Наибольшее число полиморфных локусов выявляли праймеры OPA-01, OPA-08, OPA-03, OPB-08, но даже праймеры, выявлявшие наименьшее число полиморфных локусов (OPA-18), оказались более информативными по сравнению с исследованным ISSR-праймером.

Средний уровень полиморфизма, выявляемого RAPD-праймерами, составил 67,3%, что значительно превосходит данные, полученные при использовании ISSR-праймера – 42%. На-

блюдаемые разночтения в уровнях полиморфизма можно объяснить ограниченным числом локусов, выявляемых праймером (AG)₉C, поэтому данные, полученные при использовании RAPD-праймеров, следует считать более достоверными.

Для изучения генетической структуры популяции практически любого вида достаточно 60 полиморфных RAPD-локусов, даже если ничего неизвестно об их взаимном наследовании, такие данные будут считаться достоверными, т.к. теоретически с их помощью можно генетически различить до $2^{60} \approx 10^{18}$ особей /15/.

На территории Беларуси в данный момент обитают около 780 особей *B. bonasus bonasus*, поэтому было принято решение ограничить количество используемых в дальнейших исследованиях RAPD-праймеров лишь наиболее полиморфными из них. Праймеры OPA-01, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-08 и OPB-08 в

совокупности выявляют 67 полиморфных локусов, что является достаточным для определения родства в изучаемых нами популяциях *B. bonasus*, поэтому данные праймеры были отобраны для проведения дальнейших исследований.

Нами проведена оценка генетического разнообразия беловежского зубра *Bison bonasus* Linnaeus с помощью генетических дистанций, полученных на основе ISSR- и RAPD-анализа. Отобранные на предыдущем этапе праймеры использовались для оценки генетического разнообразия образцов, представленных в нашем банке ДНК зубров. Полученные фингерпринты преобразовывались в бинарную матрицу и обрабатывались в программе MEGA 4 /16/. Расчет генетических дистанций осуществляли на основе метода Nei-Gojobori, топологию деревьев рассчитывали UPGMA-методом и верифицировали бутстрепом в 100 реплик. Данные, полученные на основе ISSR анализа, представлены в таблице 4 и на рисунке 1.

В таблице 4 генетические расстояния располагаются в правом нижнем углу, а соответствующие им ошибки – в левом. Как видно из данной таблицы, генетические дистанции варьировали от 0 (b12 /b13 – между

ними не удалось выявить различия) до 0,5 (b1/ b16) и в среднем составил 0,327, ошибка при этом колебалась в весьма значительных пределах от 0 до 0,1. Недостаточность полученных ISSR данных проявляется и на дендрограмме (рис. 1).

Так, выделяются 2 кластера, первый из которых подразделяется еще на 2 (предположительно семейные группы), но при этом с низким значением бутстепа. Помимо этого, программе не хватило данных для отнесения образца b5 к какой-либо группе, и он остался в подвешенном состоянии.

Между тем, полученные результаты согласуются с ранее опубликованными нами данными по исследованию этим же методом другой выборки /11,28/, где также наблюдалось четкое деление на 2 кластера, что может свидетельствовать о наличии в популяциях беловежского зубра 2-ух относительно генетически обособленных группировок.

Для уточнения результатов мы многократно расширили число исследуемых локусов за счет привлечения RAPD-маркеров. Данные о генетических различиях исследованных особей, полученные на основе обоих методов, RAPD и ISSR, представлены в таблице 13 и на рисунке 2.

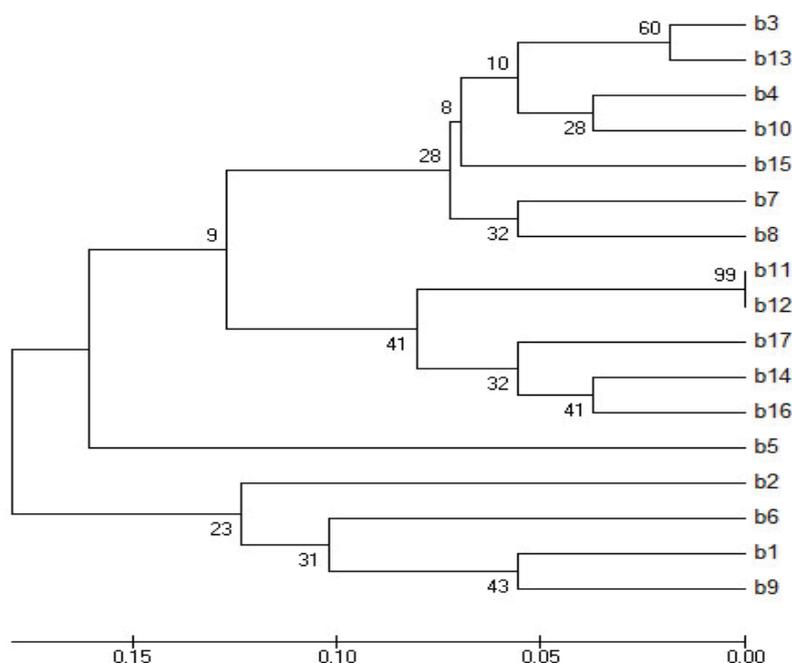


Рис. 1. Генетические различия особей *Bison bonasus* Linnaeus на основе ISSR анализа.

Таблица 4

Парные сравнения генетических расстояний и их ошибки, полученные на основе ISSR анализа

	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13	b14	b15	b16	b17
b1		0.079	0.097	0.093	0.092	0.083	0.091	0.089	0.062	0.092	0.096	0.096	0.097	0.099	0.089	0.101	0.960
b2	0.222		0.088	0.087	0.091	0.092	0.075	0.084	0.076	0.088	0.096	0.096	0.087	0.091	0.085	0.097	0.100
b3	0.444	0.296		0.051	0.086	0.082	0.060	0.069	0.086	0.066	0.082	0.082	0.037	0.068	0.072	0.070	0.084
b4	0.370	0.296	0.074		0.086	0.073	0.059	0.069	0.083	0.050	0.090	0.900	0.059	0.080	0.062	0.810	0.091
b5	0.481	0.481	0.259	0.259		0.098	0.096	0.097	0.096	0.091	0.085	0.085	0.089	0.088	0.092	0.091	0.094
b6	0.259	0.333	0.259	0.185	0.444		0.078	0.081	0.069	0.084	0.097	0.097	0.085	0.092	0.085	0.093	0.095
b7	0.333	0.185	0.111	0.111	0.370	0.222		0.062	0.080	0.074	0.094	0.094	0.068	0.087	0.067	0.087	0.096
b8	0.296	0.222	0.148	0.148	0.074	0.333	0.111		0.071	0.068	0.089	0.089	0.060	0.081	0.076	0.078	0.091
b9	0.111	0.185	0.333	0.259	0.519	0.148	0.222	0.185		0.081	0.093	0.093	0.084	0.086	0.078	0.092	0.094
b10	0.370	0.296	0.148	0.074	0.333	0.259	0.185	0.148	0.259		0.090	0.090	0.060	0.082	0.058	0.082	0.093
b11	0.519	0.444	0.222	0.296	0.259	0.481	0.333	0.296	0.481	0.296		0.000	0.075	0.063	0.089	0.067	0.070
b12	0.519	0.444	0.222	0.296	0.259	0.481	0.333	0.296	0.481	0.296	0.000		0.075	0.063	0.089	0.067	0.070
b13	0.407	0.259	0.037	0.111	0.296	0.296	0.148	0.111	0.296	0.111	0.185	0.185		0.061	0.670	0.060	0.800
b14	0.444	0.296	0.148	0.222	0.333	0.407	0.259	0.222	0.333	0.222	0.148	0.148	0.111		0.082	0.049	0.062
b15	0.333	0.259	0.185	0.111	0.296	0.222	0.148	0.185	0.222	0.111	0.259	0.259	0.148	0.259		0.083	0.093
b16	0.519	0.370	0.148	0.222	0.333	0.407	0.259	0.222	0.407	0.222	0.148	0.148	0.111	0.074	0.259		0.061
b17	0.481	0.407	0.259	0.333	0.444	0.519	0.370	0.333	0.444	0.333	0.185	0.185	0.222	0.111	0.370	0.111	

Таблица 5

Сводные оценки парных различий генетических расстояний и их ошибок, полученные на основе ISSR и RAPD анализов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. b1		0.048	0.061	0.061	0.062	0.050	0.060	0.059	0.054	0.063	0.060	0.061	0.061	0.060	0.063	0.062	0.061
2. b2	0.219		0.059	0.058	0.057	0.058	0.058	0.057	0.058	0.060	0.061	0.061	0.061	0.061	0.059	0.062	0.065
3. b3	0.547	0.422		0.037	0.048	0.058	0.045	0.050	0.061	0.047	0.052	0.052	0.043	0.049	0.050	0.050	0.055
4. b4	0.516	0.422	0.094		0.048	0.059	0.049	0.049	0.061	0.051	0.052	0.053	0.049	0.049	0.050	0.052	0.055
5. b5	0.500	0.438	0.172	0.172		0.062	0.056	0.054	0.061	0.059	0.053	0.054	0.057	0.055	0.057	0.055	0.056
6. b6	0.219	0.375	0.484	0.422	0.563		0.059	0.057	0.054	0.057	0.061	0.062	0.060	0.060	0.063	0.061	0.060
7. b7	0.453	0.328	0.156	0.219	0.297	0.484		0.042	0.059	0.051	0.059	0.060	0.053	0.056	0.050	0.057	0.060
8. b8	0.469	0.344	0.203	0.203	0.313	0.500	0.141		0.058	0.054	0.056	0.057	0.054	0.057	0.054	0.057	0.060
9. b9	0.219	0.344	0.453	0.422	0.563	0.250	0.328	0.406		0.059	0.061	0.061	0.058	0.062	0.057	0.060	0.063
10. b10	0.469	0.375	0.172	0.203	0.313	0.469	0.203	0.250	0.344		0.056	0.055	0.047	0.053	0.047	0.053	0.060
11. b11	0.563	0.500	0.234	0.266	0.313	0.531	0.328	0.344	0.438	0.281		0.025	0.040	0.036	0.051	0.039	0.041
12. b12	0.578	0.516	0.219	0.281	0.297	0.516	0.313	0.328	0.453	0.266	0.047		0.033	0.035	0.047	0.032	0.042
13. b13	0.531	0.438	0.141	0.203	0.313	0.438	0.234	0.250	0.375	0.188	0.125	0.078		0.033	0.042	0.029	0.045
14. b14	0.563	0.438	0.203	0.234	0.344	0.500	0.297	0.313	0.406	0.281	0.094	0.109	0.094		0.048	0.034	0.038
15. b15	0.422	0.359	0.219	0.219	0.297	0.391	0.219	0.297	0.328	0.172	0.234	0.188	0.141	0.234		0.045	0.054
16. b16	0.563	0.469	0.203	0.266	0.313	0.500	0.297	0.313	0.438	0.250	0.125	0.078	0.063	0.094	0.172		0.036
17. b17	0.516	0.484	0.281	0.313	0.391	0.516	0.406	0.422	0.422	0.359	0.141	0.156	0.172	0.109	0.281	0.109	

Если сравнить данные, представленные в таблице 5, с данными таблицы 4, становится ясно, что в первом случае почти вдвое меньше ошибки (верхний угол таблицы, отмечен синим), которые в данном случае не превышали 0,063.

Что касается собственно парных генетических расстояний, то разброс значений и среднее практически остались прежними и составили 0,047(b12/b11) - 0,578(b1/b12), и 0,318, соответственно, но при этом для отдельных пар произошли значительные изменения, так, например, для пары b5/b6 коэффициент увеличился с 0,444 до 0,563, а для пары b12/b13 он, наоборот, более чем вдвое уменьшился с 0,185 до 0,078. Следует добавить, что в таблице 4 не выявлено нулевое значение (0,0), что говорит об отсутствии генетически одинаковых особей, а значит, количество используемых для генетического анализа маркеров оказалось достаточно.

В целом, топология дендрограммы не претерпела существенных изменений. Основные

различия связаны с перетасовкой внутри кластеров 3-го и 4-го порядка, помимо этого, образец b5 теперь однозначно отнесен к верхнему (большему) кластеру, повысились значения будстепа основных развилки (рис. 2). Разделение на 2 основных кластера стало более резким. Нам не удалось объяснить подобную кластеризацию исходя из географического соответствия, т.к. образцы, образовавшие меньший кластер: b1, b2, b6, b9, отобраны в разных областях Беловежской пуши в различное время, поэтому вопрос о наличии и механизмах поддержания нескольких субпопуляций на территории Беловежской пуши остается открытым.

Самыми близкими между собой по генетической структуре являются особи: b3 и b4, b7 и b8, b14, b13 и b16. Эти особи отличаются между собой по 4-5 % локусам.

Особи b1 и b12 – в генетическом отношении самые дальние и различаются между собой по 15% локусам.

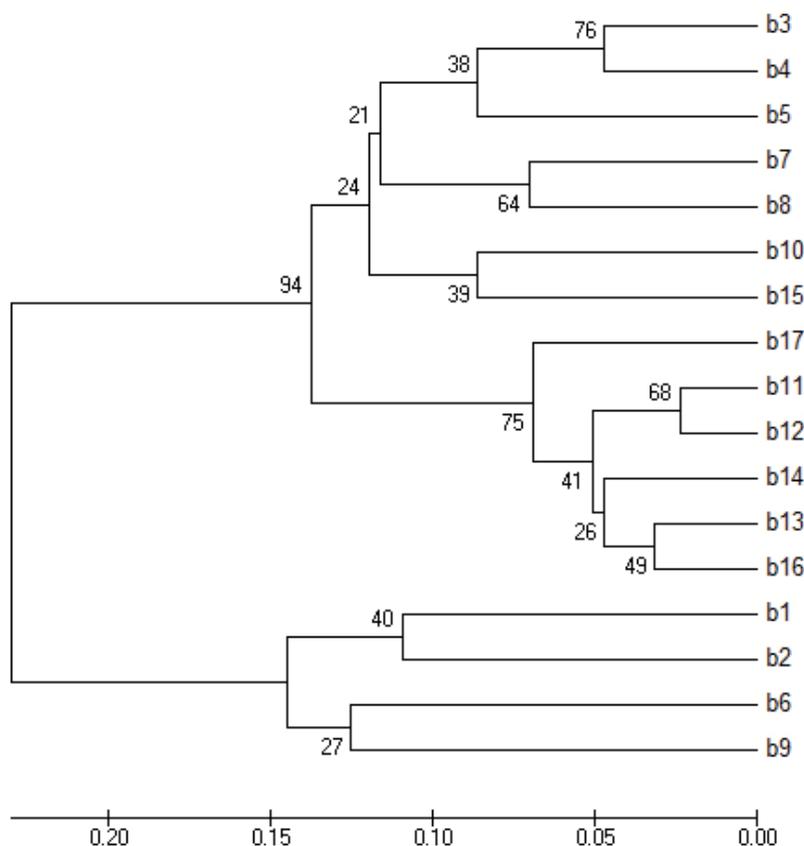


Рис. 2. Генетические различия особей из различных микропопуляций беловежского зубра *Bison bonasus* Linnaeus в Беларуси на основе RAPD и ISSR анализа.

Некоторые данные указывают на то, что популяция еще не пришла в состояние равновесия после резкого роста численности.

На основе полученных данных, с использованием поправки Холдейна для малых выборок /17/ нами была рассчитана средняя гетерозиготность исследованных локусов. Она составила 30,43%. Стоит отметить, что данное значение рассчитано исходя из предположения об идеальном и равновесном состоянии популяции, поэтому действительное значение данного параметра может существенно отличаться от расчетного.

Для прогноза предотвращения резких падений гетерозиготности в белорусской популяции беловежского зубра нами было проведено моделирование поведения данного параметра – на основе данных о количестве, половом составе, популяционной структуре, геогра-

фическом распределении, частоте и составе миграции. Для моделирования использовалась программа EASYPOP (Balloux F., 2001) /18/. Зубров рассматривали как диплоидных раздельнополых полигамных животных с эффективным отношением полов 1 к 6, существующих в 7 популяциях, численностью 400, 100, 100, 70, 70, 70 и 40 (всего 850) особей с островным типом миграции. Данное распределение примерно соответствует настоящему, с несколько завышенной численностью, в расчете на дальнейший рост. Моделирование проводилось по 100 диаллельным не сцепленным локусам с КАМ-типом мутирования и частотой 0.0001, при условии максимального начального разнообразия (средний уровень гетерозиготности 50%), на протяжении 30 поколений. Схема прогноза падения гетерозиготности представлена на рисунке 4.

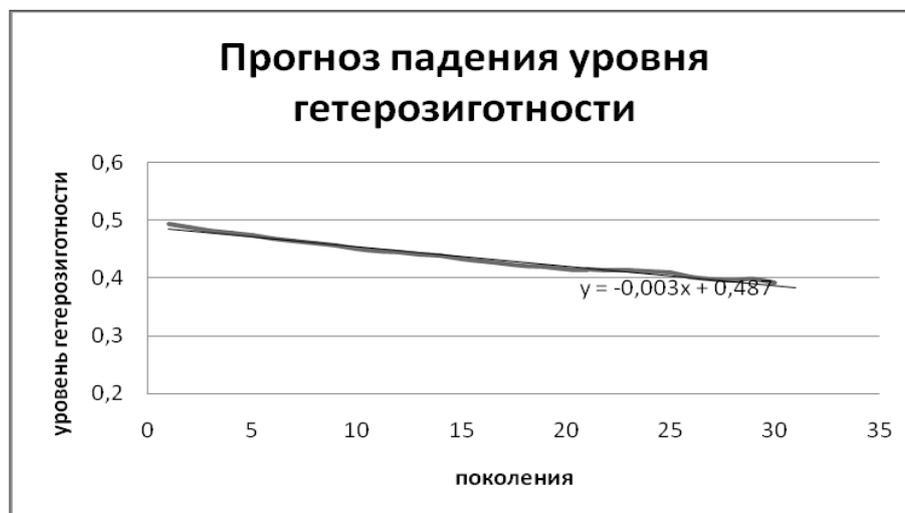


Рис. 4. Прогноз падения уровня гетерозиготности в популяции беловежского зубра *Bison bonasus* Linnaeus

За 30 поколений гетерозиготность с 50% упала до 39,3%, достигнув при этом стабильной скорости падения. Регрессионный анализ показал наклон прямой всего $-0,003$, что означает падение гетерозиготности в стабильном состоянии всего 0,3% за поколение. Таким образом, рассчитанная нами гетерозиготность (30,43%), даже при очень большой ошибке, будет находиться в области прогнозируемого уровня снижения,

поэтому ожидать резкого изменения уровня генетического разнообразия и связанного с ним уровня выживаемости – не следует /19/.

Потеря генетического разнообразия, по всей видимости, больше не угрожает белорусской популяции беловежского зубра, однако требуется продолжать работу по мониторингу генетического состояния зубра, с целью приведения его к докризисным показателям.

Заключение

1. Проанализирована генетическая структура популяции *Bison bonasus bonasus* с помощью ISSR-фингерпринтинга и RAPD-анализа.

2. Показано, что беловежский подвид зубра (*B. Bonasus bonasus*) уступает как кавказскому зубру, так и бизону по таким параметрам как доля полиморфных локусов, среднее число фрагментов генома на особь, частота встречаемости фрагментов, что доказывает обедненность генофонда беловежского зубра.

3. Показано, что более информативными по сравнению с исследованными ISSR-праймерами являются RAPD-праймеры. Средний уровень полиморфизма, выявляемого RAPD-праймерами, составил 67,3%, что значительно превосходит данные, полученные при использовании ISSR-праймера – 42%. Поэтому данные, полученные при использовании RAPD-праймеров, следует считать более

достоверными.

4. Выбраны наиболее полиморфные RAPD-праймеры: OPA-01, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-08 и OPB-08, которые в совокупности выявляют 67 полиморфных локусов, что является достаточным для определения родства в изучаемых нами популяциях *B. Bonasus* для дальнейших исследований.

5. Показано, что средний уровень полиморфизма выявляемого RAPD-праймерами составил 67,3%, что значительно превосходит данные, полученные при использовании ISSR-праймера – 42%.

6. Выявлен видоспецифичный RAPD-праймер, который может быть использован для выявления гибридизации и уровня интродукции между *B. bonasus* и *B. taurus*.

7. Проведен кластерный анализ (UPGMA-анализ), который показал, что популяция бе-

ловежского зубра достоверно образует два достаточно удаленных друг от друга кластера, что указывает на наличие генетически изолированных групп в пределах белорусской популяции *B. bonasus*.

8. Приведены сводные оценки парных различий генетических расстояний и их ошибок исследованных особей зубра, полученные на основе ISSR и RAPD анализов. Показаны самые близкие и самые далекие в генетическом отношении особи с тем, чтобы на научной основе в дальнейшем отбирать для расселения в другие участки наиболее полноценных

и удаленных друг от друга по родству представителей этого вида.

10. Показано, что гетерозиготность популяции (*Bison bonasus* Linnaeus) составляет 30,43 %, и по нашим расчетам находится в области прогнозируемого уровня снижения.

11. Потеря генетического разнообразия, по всей видимости, больше не угрожает белорусской популяции беловежского зубра, однако требуется продолжать работу по мониторингу генетического состояния зубра, с целью уменьшения инбридинга в поколениях.

Список использованных источников

1. Зубр. Морфология, систематика, эволюция, экология / под ред. В.Е. Соколова. - М.: Наука, 1979. - С. 91-111, 442-470.

2. Охрана природы. Природные ресурсы Белоруссии и их рациональное использование / Под общей редакцией Н.И. Костюкевича, А.Х. Шкляра, М.С. Долбика. - Мн.: Вышэйшая школа, 1972. - С. 367-372.

3. Корочкина, Л.Н. Беловежский зубр // Беловежская пуца: Труды заповедно-охотничьего хозяйства. - Мн., 1958. - вып. 1. - С. 7-34.

4. Буневич, А.Н. Итоги разведения зубров за 60 лет // Беловежская пуца на рубеже третьего тысячелетия: Материалы научно-практической конференции, посвященной 60-летию со дня образования Государственного заповедника «Беловежская пуца», 22-24 декабря 1999 г., п. Каменюки, Брестская область. - Мн., 1999. - С. 64-70.

5. Сипко, Т.П. Зубр. Популяционно-генетический анализ /Электрон. ресурс/. - М., декабрь, 2004. - Режим доступа: <http://bp21.org.by/ru/art/zubrsip2.html>.

6. Беловежская пуца / Корочкина Л.Н., Ковальков М.П., Толкач В.Н. и др. - Мн., 1980. - 230 с.

7. Раутиан Г.С., Калабушкин Б.А., Немцев, А.С. Новый подвид зубра *B. b. montanus* ssp. // Доклады академии наук. Общая биология. - 2000. - т. 375, № 4. - С. 563-567.

8. Дерябина, Т.Г. Нарушение микроэлементного баланса – возможная причина заболеваемости зубров гнойно-некротическим баланопоститом // Беловежская пуца на рубеже третьего тысячелетия: Материалы научно-

практической конференции, посвященной 60-летию со дня образования Государственного заповедника «Беловежская пуца», 22-24 декабря 1999 г., п. Каменюки, Брестская область. - Мн., 1999. - С. 277-278.

9. Экологические и ветеринарные аспекты зубров в Беларуси / П.А. Красочко, П.Г. Козло, И.А. Красочко и др.; Под ред. П.А. Красочко. - Мн.: Бизнесофсет, 2004.

10. Козло, П.Г. Динаміка численності зубрів (*Bison bonasus*) в Україні // Лісівництво України в контексті світових тенденцій розвитку лісового господарства: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 150-річчю витоків кафедри лісівництва НЛТУ України. - Львів: НЛТУ України, 2006. - С. 230-232.

11. Caetano-Anolles, G., Gresshoff, M. DNA amplification fingerprinting using arbitrary mini-hairpin oligonucleotide primers // Biotechnology. - 1994. - 12. - P. 619-623.

12. Городная, А.В., Глазко, В.И. ISSR-PCR в дифференциации генофондов пород крупного рогатого скота // Цитология и генетика. 2003. Т. 37. № 1. С. 61-67.

13. Stephens J.C., Gilbert D.A., Yuhki N., O'Brien S.J. Estimation of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints // Mol. Biol. Evol. 1992. V. 9. № 4. P. 729-743.

14. Кочиева Е.З., Рыжова Н.Н., Храпалова И.А., Пухальский В.А. Определение генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Lycopersicon* (Tourn) Mill. методом маркирования межмикросателлитных последова-

- тельность (ISSR) // Генетика. 2002. Т. 38. №8. С. 1133–1142. (Kochieva E.Z., Ryzhova N.N., Khrapalova I.A., Pukhalskyi V.A. Genetic diversity and phylogenetic relationships in the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) analysis // Rus. J. Genetics. 2002. V. 38. № 8. P. 958–966).
15. Neve G., Meglecz E. // Trends Ecol. Evol. 2000. V. 15. N.9. P. 376.
16. Koichiro T., Dudley J., Nei M., Kumar S., MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0, Mol. Biol. Evol. 24(8):1596–1599. – 2007/
17. Haldane J.B.S., The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies, Ann. Human Genet., 20, 309-311 (1956).
18. Balloux, F., EASYPOP (version 1.7), (2001) A computer program for the simulation of population genetics. J. Heredity 92: 301-302.
19. Оценка генетического разнообразия популяций зубра с помощью метода ISSR-фингерпринтинга. (Михайлова М.Е., Сулимова Г.Е., Тиханович Н.И., Моссэ И.Б., Камыш Н.А.) // Молекулярная и прикладная генетика. Научные труды. Минск, 2005. стр. 182.

Дата поступления статьи 1 октября 2010 г.

Н.И. Дубовец¹, Е.А. Сычева¹, Л.А. Соловей¹, Т.И. Штык¹, Е.Б. Бондаревич¹,
И.Г. Адонина², Е.А. Салина², Л.Ф. Кабашникова³, Г.Е. Савченко³, Л.М.Абрамчик³

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ХРОМОСОМНО-ЗАМЕЩЕННЫХ ЛИНИЙ ГЕКСАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПРАКТИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²Институт цитологии и генетики СО РАН

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 10

³ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

В работах по интрогрессии хромосом D-генома пшеницы в кариотип гексаплоидных тритикале путем гибридизации 8х- × 4х-тритикале нами был создан разнообразный в генетическом отношении материал с содержанием различных типов D(A)- и D(B)-замещений хромосом. Несмотря на то, что каждая из созданных рекомбинантных форм 6х-тритикале представляла собой потомство одного гибридного растения, все они характеризовались неоднородным хромосомным составом [1]. Это связано с особенностями геномной структуры гибридов F₁, которые в своем кариотипе наряду с диплоидными содержат гаплоидные наборы хромосом исход-

ных родительских форм. Взаимозамещения хромосом гаплоидных наборов в ходе стабилизации рекомбинантного генома теоретически могут привести к возникновению в потомстве каждого гексаплоидного гибрида F₁ 2187 (3⁷) вариантов различных сочетаний хромосом А-, В- и D-геномов пшеницы. В действительности их образуется значительно меньше, но присутствие в пределах формы даже двух вариантов кариотипа делает её непригодной для практического использования. В связи с этим нами была проделана работа по созданию идентифицированных линий хромосомно-замещенных гексаплоидных тритикале со стабильным одновариантным кариотипом.

Материалы и методы

Исходным материалом для создания коллекции послужили рекомбинантные формы гексаплоидных тритикале, полученные путем гибридизации октоплоидных тритикале 25АД20, ПРАО1 и ПРАД 20 (2n=8х=56; геном AABBDDRR) с созданными нами популяциями тетраплоидных тритикале ПРАТ 12, ПРАТ 16, ПРАТ 69 и ПРАТ 72 (2n=4х=28; геном А/ВRR). Помимо 4х-тритикале нашей селекции

к участию в скрещиваниях была привлечена форма ПРАТ 21 селекции Дагестанской опытной станции ВИР, любезно предоставленная д.б.н. Куркиевым У.К.

Весь гибридный материал был маркирован с использованием С-бэндинга [2]. Часть линий из комбинации скрещивания 25АД20 × ПРАТ 21 дополнительно была проанализирована с использованием методов FISH [3] и GISH [4].

Результаты и обсуждение

В ходе создания коллекции линий хромосомно-замещенных гексаплоидных тритикале первоначально нами была предпринята попыт-

ка выделения из гибридного материала, линий с одиночными D(A)- и D(B)-замещениями хромосом. Для этой цели гибридные зернов-

ки проращивались и высаживались в поле с одновременной фиксацией корешков для идентификации хромосомного состава растения. Однако такой подход оказался малорезультативным по двум причинам. Во-первых, в полученном материале наблюдалось явное преобладание растений с множественными межгеномными замещениями хромосом. Во-вторых, проводимое одновременно с посадкой кариотипирование гибридных растений сильно ограничивало объем включенного в эксперимент материала.

В связи с этим нами был разработан другой методический прием, рассчитанный на быстрое выделение из гибридного материала более поздних поколений линий с одновариантным кариотипом, отличающихся друг от друга количественным и качественным составом межгеномных замещений хромосом. Возможность такого выделения обусловлена тем фактом, что у замещенных гексаплоидных тритикале стабилизация рекомбинантного генома происходит довольно быстро, вследствие

чего кариотипы растений $F_5 - F_6$, как правило, содержат во всех гомеологичных группах пары гомологов. Таким образом, на основе каждого гибридного растения можно создать линию тритикале с характерным для этого растения хромосомным составом.

Для получения линейного материала в пределах каждой гибридной формы было произвольно отобрано по 10 растений, которые выращивались в условиях принудительного самоопыления. Часть зерен с каждого растения использовалась для идентификации хромосомного состава. Остальные зерна после завершения анализа объединялись в соответствии с установленными вариантами кариотипа. В итоге была сформирована коллекция из 24 линий гексаплоидных тритикале, выделенных из гибридного материала четырех комбинаций скрещиваний $8x \times 4x$ -тритикале и характеризующихся различными как в качественном, так и количественном планах межгеномными замещениями хромосом пшеницы (рисунки 1, 2), перечень которых представлен в таблице 1.

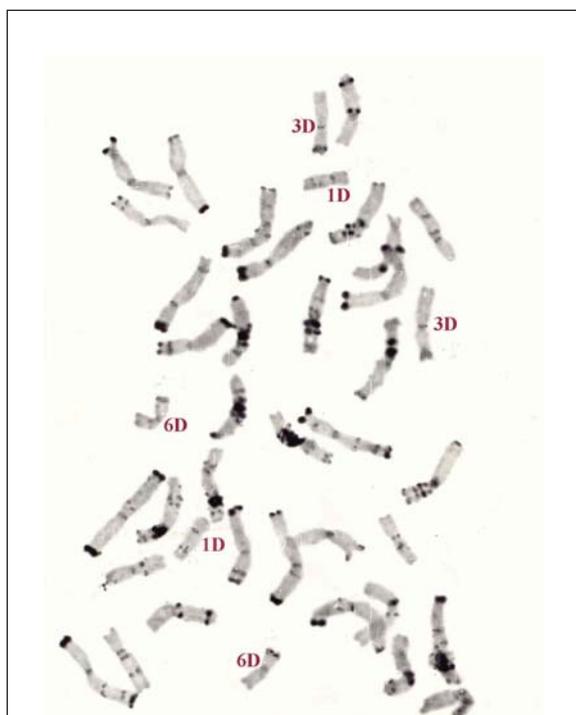


Рис. 1. Кариотип линии М II(2), маркированный с помощью С-бэндинга



Рис. 2. Кариотип линии М V(3), маркированный с помощью FISH (D-геном) и GISH (R-геном)

Таблица 1

Типы межгеномных замещений хромосом у линий гексаплоидных тритикале

Комбинация скрещивания	Линия	Типы межгеномных замещений хромосом
25АД20 × ПРАТ21	М I(1)-1	1D(1A), 2D(2B), 6D(6B)
	М I(1)-2	1D(1A), 2D(2B)
	М I(2)-1	1D(1A), 6D(6B)
	М I(2)-2	1D(1A), 2D(2B), 6D(6B)
	М I(2)-3	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A), 6D(6B)
	М II(2)	1D(1A), 3D(3A), 6D(6B)
	М II(3)-1	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A), 6D(6B)
	М II(3)-2	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A) и 6D(6A)
	М III(2)	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A)
	М V(1)	1D(1A), 2D(2B)
	М V(2)	1D(1A), 2D(2B)
	М V(3)	1D(1A)
	М V(4)	1D(1A)
	М V(5)	1D(1A), 2D(2B)
	М V(5)-1	1D(1A), 2D(2B) (T5RS.5AL)
	YI(1)-1	1D(1A)
	YI(1)-2	1D(1A), 2D(2B)
	М VIII(2)	1D(1A), 3D(3A)
	М VIII(3)	1D(1A), 3D(3A)
	37(1)	1D(1A), 6D(6B) (T5AS.5AL-5BL)
ПРАО1 × ПРАТ72	4(2)-1	1D(1A), 2D(2A), 4D(4B), 7D(7A)
	4(2)-2	2D(2A), 4D(4B), 7D(7A)
	7	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A)
ПРАД20 × ПРАТ12	12	1D(1A), 2D(2B)
ПРАД20 × ПРАТ72	8	1R(1A) , 3D(3B), 4D(4B)
	15	1D(1A)

Следует отметить тот факт, что многие выделенные из комбинации скрещивания 25АД20 × ПРАТ21 линии имеют одинаковый набор замещений, однако мы сочли целесообразным не объединять их по этому признаку. Как показал сравнительный анализ цитологической стабильности и продуктивности замещенных форм тритикале, линии с одинаковым хромосомным составом могут существенно различаться по исследуемым признакам. Такие различия объясняются сложной гибридной природой экспериментального материала (включая исходные родительские формы), чем обеспечивается разнообразие сочетаний аллельных вариантов генов в пределах одной комбинации скрещивания.

В коллекцию были включены также линии, которые помимо D(A)- и D(B)-замещений хро-

момам могут существенно различаться по исследуемым признакам. Такие различия объясняются сложной гибридной природой экспериментального материала (включая исходные родительские формы), чем обеспечивается разнообразие сочетаний аллельных вариантов генов в пределах одной комбинации скрещивания.

мосом содержат пшенично-ржаные транслокации, а также линия тетрасомная по хромосоме 1R и нуллисомная по 1A.

Созданные рекомбинантные линии гексаплоидных тритикале, в первую очередь, являются ценным исходным материалом в селекции культуры на повышение качества зерна. Ранее нами было показано, что интрогрессия в кариотип тритикале хромосом D-генома пшеницы приводит к увеличению содержания белка в зерне и улучшению качества клейковины, причем преимущество в этом плане имеют формы с множественными межгеномными замещениями хромосом пшеницы (3-4 пары) [5]. В связи с этим совместно с сотрудниками лаборатории тритикале РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» были начаты работы по интрогрессии хромосом D-генома пшеницы в перспективные районированные сорта тритикале. В результате скрещивания лучших из них с хромосомно-замещенными линиями был получен обширный гибридный материал, в пределах которого в ближайшее время по результатам комплексной оценки будут выделены сортообразцы с улучшенными технологическими качествами зерна.

Кроме того, коллекционные линии могут быть использованы для изучения эффектов интрогрессии хромосом D-генома пшеницы в кариотип гексаплоидных тритикале на проявление различных хозяйственно-полезных признаков.

Так, нами была проведена работа по исследованию эффектов различных типов D(A)- и D(B)-замещений на экспрессию признаков продуктивности, в частности, элементов продуктивности колоса.

Разделение замещенной формы MI(1) на линии с тремя и двумя межгеномными замещениями, различающимися по хромосомному составу лишь шестой гомеологической группы, позволяет оценить возможный эффект присутствия в кариотипе 6D(6B)-замещения хромосомом.

По морфологическим признакам колоса линии отличаются друг от друга незначительно (рисунок 3). Можно лишь отметить, что у линии MI(1)-1 в меньшей степени выражена остистость и наблюдается более выраженное сужение колоса к вершине, что присуще колосьям веретеновидной формы. Кроме того, линия MI(1)-1 характеризуется более плотным



Рис. 3. Зрелые колосья линий а) MI(1)-1; б) MI(1)-2



Рис. 4. Зрелые колосья линий а) MII(3)-1; б) MII(3)-2



Рис. 5. Зрелые колосья линий а) №4(2)-1; б) №8; в) MIII(2)

Таблица 2

Характеристика основных элементов продуктивности колоса замещенных линий гексаплоидных тритикале

Линия	Длина колоса, см	Кол-во колосков, шт	Плотность колоса	Кол-во цветков, шт	Кол-во зерен, шт	Озерненность колоса	Масса 1000 зерен, г
МП(1)-1	11.20±0.16	27.17±0.33***	2.43	72.83±1.18*	41.10±1.06**	56.40	43.10
МП(1)-2	10.88±0.17	23.56±0.23***	2.17	78.03±1.87*	46.13±1.55**	59.12	47.40
МП(3)-1	10.32±0.16***	22.30±0.28***	2.16	62.63±1.41***	28.40±1.36***	45.30	47.00
МП(3)-2	11.25±0.12***	23.87±0.25***	2.12	77.03±1.66***	38.30±2.22***	49.72	37.40
МIV(5)-1	8.50±0.20**	20.50±0.37**	2.41	54.20±1.41**	37.53±0.94**	69.20	50.90
МIV(5)-2	9.48±0.25**	22.20±0.37**	2.34	61.03±1.67**	44.07±1.83**	72.20	47.60
8	12.58±0.19	25.83±0.40	2.05	80.23±1.58	28.97±2.22	36.10	28.80
4(2)-1	15.43±0.21	27.53±0.26	1.78	87.40±1.43	35.73±2.58	40.89	30.60
4(2)-2	14.78±0.26	27.33±0.24	1.85	84.50±1.51	35.80±2.69	42.40	31.20

колосом: среднее значение этого показателя у нее равно 2,43 против 2,17 у линии МI(1)-2. Различия по длине колоса между линиями недостоверны.

Достоверные различия наблюдаются по таким показателям продуктивности, как число колосков в колосе, число цветков в колосе и количество зерен в колосе (таблица 2). Среднее значение первого показателя выше у линии с тремя замещениями, а второго и третьего – у линии с двумя замещениями. Линия МI(1)-2 характеризуется также лучшей озерненностью колоса и лучшей массой 1000 зерен (47,4 против 43,1).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что присутствие в кариотипе гексаплоидных тритикале 6D(6B)-замещения хромосом в определенной степени оказывает негативное влияние на экспрессию ряда признаков продуктивности растений. Отмеченный негативный эффект может быть вызван как интрогрессией пары хромосом 6D, так и удалением из кариотипа растений пары хромосом 6B. Для выяснения вопроса, какое из этих двух событий наиболее значимо, было проведено сравнительное исследование линий МII(3)-1 и МII(3)-2, содержащих три идентичных замещения (1D(1A), 2D(2B), 3D(3A)) и различающихся по четвертому – у первой линии хромосома 6D заменила 6B, а у второй – 6A. Различия между этими линиями (в отличие от двух предыдущих) проявлялись уже на уровне морфологических признаков колоса (рисунок 4). Колосья первой линии имели красную окраску и веретеновидную форму, в то время как колосья второй линии были белыми цилиндрической формы. При практически одинаковой плотности колоса (2,16 и 2,12) высоко достоверные различия (при $P > 0,001$) наблюдались по всем признакам продуктивности колоса. При этом линия с 6D(6A)-замещением хромосом по всем показателям превосходила линию с 6D(6B)-замещением. Единственное исключение составил признак «масса 1000 зерен», который у первой линии был равен 47 г, а у второй – 37,4 г. Изложенное свидетельствует о том, что снижение продуктивности растений линии МI(1)-1 не связано с наличием дополнительной пары хромосом 6D, а является следствием отсутствия в их кариотипе пары хромосом 6B. Исходя из этого

можно сделать вывод о том, что интрогрессию в кариотип гексаплоидных тритикале хромосомы 6D предпочтительнее осуществлять в виде 6D(6A)-замещения.

Определенный интерес для нас представляло также исследование эффектов присутствия в кариотипе 6х-тритикале хромосомы 4D. Известно, что хромосомы четвертой гомеологической группы пшеницы содержат гены, ответственные за высоту растений: на хромосоме 4A расположен ген *Rht 1*, на хромосоме 4D – *Rht 2*. Рецессивные аллели этих генов наиболее широко используются в селекции на короткостебельность. При этом показано, что объединение их в одном генотипе приводит к суммированию положительного эффекта. Отмечается также, что при таком объединении наибольший вклад в сокращение высоты растений и одновременное удлинение колоса вносит локализованный на хромосоме 4D ген *Rht 2* [6].

В нашем материале у трех линий (4(2)-1, 4(2)-2 и 8) хромосома 4D замещает 4B. Эффекты такого замещения могут быть как положительными, так и отрицательными, в зависимости от аллельных вариантов присутствующих в линиях генов *Rht*.

Проведенное исследование показало, что у всех трех вышеперечисленных линий наблюдается существенное увеличение длины колоса растений, что особенно характерно для линий 4(2)-1 и 4(2)-2, имевших среднее значение этого признака на 4-5 см выше, чем у линий из комбинации скрещивания 25АД20 х ПРАТ 21. В то же время обе линии характеризовались низким значением показателя «плотность колоса» (1,78 и 1,85), что, безусловно, отразилось на проявлении таких признаков, как количество зерен в колосе и масса зерна с колоса. Последний признак у обеих линий едва превысил 1г. Посредственным оказалось также значение такого важного в селекционном плане показателя, как масса 1000 зерен – 30,6 и 31,2.

У линии 8 значение признака «длина колоса» было в среднем на 1,5-3 см больше, чем у линий из комбинации скрещивания 25АД20 х ПРАТ 21, но на 2-3 см ниже, чем у 4(2)-1 и 4(2)-2 (рисунок 5). Несмотря на некоторое увеличение плотности колоса, линия характеризовалась более низкими (по сравнению

с линиями 4(2)-1 и 4(2)-2 значениями таких показателей, как число колосков в колосе ($25,83 \pm 0,40$ против $27,53 \pm 0,26$ и $27,33 \pm 0,24$), число цветков в колосе ($80,23 \pm 1,58$ против $87,40 \pm 1,43$ и $84,50 \pm 1,51$), количество зерен в колосе ($28,97 \pm 2,22$ против $35,73 \pm 2,58$ и $35,80 \pm 2,69$). Масса зерна с колоса в среднем составила $0,83$ г, а масса 1000 зерен – $28,8$ г. Столь низкие показатели продуктивности этой линии, скорее всего, связаны с наличием четырех доз хромосомы 1R.

Полученные данные свидетельствуют о том, что интрогрессия в кариотип 6х-тритикале хромосомы 4D приводит к существенному увеличению длины колоса, однако, положительной корреляции между этим признаком и продуктивностью колоса в нашем материале не отмечено. К тому же у исследованных форм наблюдается увеличение высоты растений, вследствие чего они склонны к полеганию. Отмеченные эффекты можно объяснить тем, что использованные в скрещиваниях отцовские формы октоплоидных тритикале (доноры хромосом D генома) содержат доминантный аллель гена *Rht 2*.

Исходя из того, что у тритикале структурные перестройки между хромосомами пшеницы и ржи являются довольно редким событием, определенный интерес представляло сравнительное исследование линий MY(5)-1 и MY(5)-2, содержащих 1D(1A)- и 2D(2B)-замещения и различающихся по наличию у первой линии пары абберрантных T5RS.5AL хромосом. Обнаруженная в гибридном материале абберрантная хромосома образовалась в результате центрального слияния двух телосом – 5RS и 5AL, которые, в свою очередь, возникли вследствие *misdivision* унивалентных хромосом в анафазе мейоза. В итоге мы имеем линию, тетрасомную по короткому плечу хромосомы 5R и нуллисомную по короткому плечу хромосомы 5A. Произшедшие структурные преобразования хромосом не отразились на экспрессии морфологических признаков растений, но оказали определенное негативное влияние на их продуктивность. Линия MY(5)-2 имела достоверно более высокие (при $P < 0,01$) показатели длины колоса ($9,48 \pm 0,25$ против $8,5 \pm 0,2$), числа колосков в колосе ($22,2 \pm 0,37$ против $20,5 \pm 0,37$), числа цветков в колосе ($61,03 \pm 1,67$ против $54,2 \pm 1,41$) и количества

зерен в колосе ($44,07 \pm 1,83$ против $37,53 \pm 0,94$). Единственным исключением, как и в случае с двумя предыдущими линиями, явилась масса 1000 зерен – у линии с абберрантной хромосомой она оказалась выше ($50,9$ г против $47,6$ г), что, скорее всего, связано с более низкой озерненностью колоса. Следует, однако, отметить тот факт, что по ряду признаков продуктивности линия MY(5)-1 ничуть не уступала и даже превосходила некоторые замещенные линии из комбинации скрещивания 25AD20 x ПРАТ 21.

Между тем, получение стабильно высоких урожаев основных зерновых культур определяется не только ростом потенциальной продуктивности культивируемых растений, но и их способностью противостоять действию абиотических стрессов.

В формировании адаптивного ответа растений на воздействие таких стрессовых факторов, как высокие и низкие положительные температуры, анаэробия, засуха ведущую роль играют фотосинтетические структуры, о чем свидетельствуют многочисленные литературные данные [7, 8]. Исходя из этого, мы сочли корректным использовать функциональное состояние фотосинтетического аппарата в качестве тест-системы для изучения стрессоустойчивости рекомбинантных форм тритикале и выявления возможных эффектов интрогрессии хромосом D-генома пшеницы на способность растения противостоять стрессу, в частности, тепловому шоку.

Исследование проводили на этиолированных проростках, выбор которых обусловлен тем, что на стадии этиоляции, как самом раннем этапе биогенеза растения, проростки, не имеющие сформированного фотосинтетического аппарата, наиболее подвержены стрессу и наименее устойчивы [9]. Кроме того, этиолированные листья злаков удобны для измерения низкотемпературных спектров флуоресценции предшественника хлорофилла – протохлорофиллида (Пд). Известно, что в оптимальных физиологических условиях в этиолированных листьях злаков преобладает флуоресценция формы с максимумом свечения при 657 нм (Пд657), а при переходе растения в состояние стресса в неблагоприятных условиях растет интенсивность флуоресценции коротковолновой формы с максимумом при 635 нм (Пд635).

Таким образом, об устойчивости проростков к стрессу можно судить по изменению величины отношения интенсивности свечения форм Пд (Пд657/Пд635) в сравнении с контролем – чем меньше изменяется эта величина, тем выше устойчивость к стресс-факторам (в нашем случае речь идет о термоустойчивости). В то же время сильное изменение соотношения в пользу коротковолнового Пд (снижение отношения Пд657/Пд635) свидетельствует о высокой стрессочувствительности исследуемого растительного объекта.

В эксперимент были включены 8 линий бх-тритикале с наличием следующих типов межгеномных замещений хромосом:

- М V(4) – 1D(1A);
- М V(1) – 1D(1A), 2D(2B)

- М I(2)-1 – 1D(1A), 6D(6B);
- М I(1)-1 – 1D(1A), 2D(2B), 6D(6B);
- М III(2) – 1D(1A), 2D(2B), 3D(3A);
- М II(2) – 1D(1A), 3D(3A), 6D(6B);
- М II(3)-2 – 1D(1A), 2D(2B), 3D(3A), 6D(6A);
- М II(3)-1 – 1D(1A), 2D(2B), 3D(3A), 6D(6B).

В таблице 3 приведены усредненные результаты измерений (не менее 4-5 повторностей) низкотемпературных спектров одинаковых участков листа контрольного и шокового варианта (ТШ), в котором проростки нагревали в течение 3 ч при 42°C, а затем выдерживали 1 ч при 23°C для достижения устойчивого стабильного состояния пигментов.

Таблица 3

Изменение параметров флуоресценции двух форм протохлорофиллида (Пд657/Пд633) в листьях 8-дневных этиолированных проростков бх-тритикале под влиянием теплового шока

Вариант опыта	Линии бх-тритикале							
	М V(4)	М V(1)	М I(2)-1	М I(1)-1	М III(2)	М II(2)	М II(3)-2	М II(3)-2
Контроль	6,86 ±0,59	5,53 ±0,24	3,02 ±0,38	2,70 ±0,10	2,89 ±0,14	3,04 ±0,20	4,85 ±0,22	3,50 ±0,18
ТШ	1,18 ±0,08	1,89 ±0,15	0,63 ±0,02	1,21 ±0,04	1,15 ±0,08	1,68 ±0,13	1,95 ±0,04	1,51 ±0,12
Контроль/ТШ	5,8	2,9	4,8	2,2	2,5	1,8	2,5	2,3

Примечание: контроль – листья проростков, выращенных при 23°C, шоковый вариант (ТШ) – проростки в рулонах выдерживали 3 ч при 42°C.

Как видно из данных таблицы, наиболее стрессочувствительной (т.е., менее устойчивой) оказалась линия М V(4) с одиночным 1D(1A)-замещением хромосом, действие теплового стресса на которую приводило почти к 6-кратному снижению степени агрегации Пд по сравнению с контролем. Учитывая тот факт, что у сорта гексаплоидного тритикале Ульяна в условиях теплового стресса наблюдается лишь двухкратное (2,2) снижение исследуемого показателя, можно сделать вывод о сильном негативном влиянии данного типа замещений на способность тритикале противостоять стрессу.

Введение в кариотип дополнительного 2D(2B)-замещения (линия М V(1)) в значительной степени (в два раза) гасило этот негативный эффект, в то время как стрессочувствительность линии М I(2)-1 с дополнительным 6D(6B)-замещением была сопоставима с М V(4), хотя отношение Пд657/Пд633 у неё даже в контроле сильно отличалось от величины, характерной для этой линии. Этот факт можно интерпретировать как отсутствие влияния 6D(6B)-замещения хромосом на исследуемый признак.

У всех остальных линий, характеризующих-

ся наличием 3-4-х межгеномных замещений, наблюдалась примерно одинаковая реакция на тепловой стресс: степень агрегации Пд после шока отличалась от контроля в 1,8 – 2,5 раза, что вполне сопоставимо с реакцией выше-названного сорта тритикале. При этом линия

М П(2) по своей стрессоустойчивости даже превысила сорт. Полученные данные еще раз подтверждают перспективность включения в селекционный процесс рекомбинантных форм тритикале с множественными межгеномными замещениями хромосом.

Заключение

Представленные выше результаты исследований с одной стороны наглядно демонстрируют возможность использования созданного нами линейного материала для изучения эффектов интрогрессии хромосом D-генома пшеницы в кариотип 6х-тритикале, а с другой стороны свидетельствуют о том, что межгеномные замещения могут иметь значимый эффект на проявление не только качественных, но и полигенно наследуемых количественных

признаков. Полученную информацию следует учитывать в работах по интрогрессивной гибридизации при разработке стратегии реконструкции кариотипа тритикале с целью улучшения ряда хозяйственно-полезных признаков культуры.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант №Б09СО-004).

Список использованных источников

1. Дубовец, Н.И. Реконструкция кариотипа гексаплоидных тритикале путем межгеномных замещений хромосом / Н.И. Дубовец, Г.В. Дымкова, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, В.Е. Бормотов // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 10. – С. 1394–1399.
2. Бадаев, Н.С. Идентификация хромосом А и D геномов пшеницы с использованием замещений и перестроек между гомеологами у пшеницы и тритикале / Н.С. Бадаев [и др.] // Докл. Акад. Наук СССР. – 1983. – Т. 273., № 4. – С. 994–996.
3. Salina, E.A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids / E.A. Salina [et al.] // Genome. – 2006. – Vol. 49, № 8. – P. 1023–1035.
4. Schubert, I. An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat / I. Schubert [et al.] // Plant Journal. – 1998. – Vol. 14, № P. 489–495.
5. Dubovets N.I. Comparative cytological and biochemical study of synthetic hexaploid triticale with different number of intergenomic chromosome substitutions / N. I. Dubovets, G.V. Dymkova, L.A. Solovei, E.A. Sytcheva, T.I. Shtyk, V.E. Bormotov / Proc. 4-th Intern. Triticale Symp. Juskiw P. (ed.) Alberta. Canada. 1998. – Vol. 2. – P. 275–278.
6. Worland, T., Genetic basis of worldwide wheat varietal improvement / T. Worland, Snape J.W. // The world wheat book: A history of wheat breeding, Lavoisier Publishing, Paris. – 2001. – P. 59–100.
7. Sofronova, V.E. Carotenoid involvement in the regulation of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid resistance to cold shock / V.E. Sofronova, V.A. Chepalov, K.A. Petrov // J. of Stress Physiology & Biochemistry. – 2006. – Vol. 2, № 1. – P. 16–20.
8. Чиркова, Т.В. Пути адаптации растений к гипоксии и аноксии / Т.В. Чиркова – Л. : Изд-во ЛГУ, 1988. – 244 с.
9. Савченко, Г.Е. Структурная перестройка мембран этиопластов при тепловом стрессе / Г.Е. Савченко, Е.А. Ключарева, Л.Ф. Кабашникова // Биологические мембраны. – 2006. – Т. 23, № 6. . – С. 476 – 483.

Дата поступления статьи 29 ноября 2010 г.

ВЛИЯНИЕ *HinFI*-ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ГИПОФИЗАРНОГО ФАКТОРА РОСТА *bPit-1* НА ПРИЗНАКИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ И БЕЛОРУССКОЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОД

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

Введение

В настоящее время в большинстве стран Европы, где ведется интенсивная селекционная работа, широкое распространение получили современные биотехнологии, способные повысить точность и эффективность традиционной селекции. К ним относится маркер-сопутствующая селекция, которая сочетает информацию о полиморфных вариантах генов-кандидатов с данными об их фенотипическом проявлении. Поиск генов-кандидатов ведется среди генов соматотропинового каскада, которые регулируют не только ростовые процессы, но и лактацию у млекопитающих, в частности, крупного рогатого скота. Интенсивность экспрессии данных генов находится под контролем клеток гипоталамической области, выделяющих стимулирующий рилизинг-фактор – соматолиберин (*Pit1*). Поэтому любые мутации, изменяющие экспрессию гена *Pit-1*, могут влиять на работу всего каскада и представляют собой интерес для возможного применения в MAS-селекции. В Беларуси исследования в этом направлении находятся на начальном этапе развития, но, несомненно, имеют большое практическое значение.

Нами был исследован *bPit-1-HinFI*-полиморфизм, обусловленный G→A заменой в шестом экзоне [1, 2]. Данный полиморфизм

не сопровождается изменением аминокислотной последовательности белка и, тем не менее, является общепринятым молекулярным маркером продуктивности у молочных пород крупного рогатого скота. Данные об ассоциации *bPit-1-HinFI*-полиморфизма с такими признаками молочной продуктивности, как общий удой за 305 суток лактации, жирномолочность и белковомолочность у коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород в Беларуси получены нами впервые.

Объект исследования – популяции крупного рогатого скота голштинской и белорусской черно-пестрой пород. Интерес к голштинской породе обусловлен тем, что ее представители являются мировыми лидерами молочной продуктивности и активно используются белорусскими селекционерами для повышения продуктивности пород, разводимых на территории Беларуси. Представители белорусской черно-пестрой породы, несмотря на более низкий уровень молочной продуктивности, адаптированы к условиям климата, кормовой базе и обладают устойчивым иммунитетом к заболеваниям, распространенным на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из проб крови коров, предоставленных животноводческими предприятиями Минской области. Источником данных о продуктивности являлись племенные карты, заполняемые зоотехниками-селекционерами для каждого животного.

Статистическая оценка проведена с использованием стандартного пакета программ «*STATISTICA 6.0*» (*StatSoft, Ink. 1994-2001*).

Так как число выявленных животных с редкими генотипами не позволяет определить характер распределения исследуемых параметров в этих группах, то оценка количествен-

ных признаков осуществлялась с использованием методов непараметрической статистики. Данные представлены в виде M_e (25%; 75%), где M_e – медиана признака – мера центральной тенденции, характеризующая срединное положение признака в вариационном ряду. Интерквартильный размах признака описывается с помощью 25% и 75% перцентилей – (верхняя граница 1-го и нижняя граница 4-го квартилей) [3].

Оценка влияния генотипа на исследуемые признаки проводилась путем сравнения показателей продуктивности в группе животных с определенным генотипом и выборкой в целом. Статистический анализ результатов осуществлялся с помощью серийного критерия τ Вальда-Вольфовица. Данный критерий является чувствительным к любым различиям распределения в выборках и применим при оценке малого числа наблюдений, что позволяет проводить анализ продуктивности животных с редкими генотипами. Проверяется H_0 гипотеза о том, что сравниваемые группы принадлежат к одной генеральной совокупности. Если нулевая гипотеза отклоняется ($p < 0,05$), то следует принять альтернативную гипотезу о существовании различий [4].

Полученные данные во всех случаях рассматривались как статистически значимые при $p < 0,05$.

Определение генотипа исследуемых осо-

бей осуществлялось методом ПЦР–ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

Условия ПЦР следующие: - 94 °C - 1 мин; (95 °C - 45 сек; 56 °C - 1 мин; 72 °C - 2 мин) x 35 циклов; 72 °C - 10 мин [5]. Длина амплифицируемого фрагмента составляет 451 п.н. Праймеры для амплификации имеют следующие последовательности:

bPit-1-HinFI-F: 5'-aaaccatcatctcccttctt-3'

bPit-1-HinFI-R: 5'-aatgtacaatgtgccttctgag-3'

Оценка результатов ПЦР проводилась с помощью рестриктазы *HinFI*, разрезающей амплифицируемый фрагмент в случае присутствия нуклеотида А (такой аллель обозначен как *bPit-1-HinFI^B*). Разделение продуктов рестрикции проводилось методом электрофореза в 2% агарозном геле. Визуализация продуктов рестрикции осуществлялась путем окрашивания бромидом этидия. У животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* на электрофореграмме наблюдался один фрагмент длиной 451 п.н. У животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* наблюдаемых фрагментов было два: 244 и 207 п.н. Гетерозиготные генотипы *bPit-1-HinFI^{AB}* на электрофореграмме визуализировались как полосы, характерные для обоих полиморфных вариантов гена *bPit-1*: 451, 244 и 207 п.н. На рисунке 1 приведена электрофореграмма продуктов рестрикции наблюдаемых при обработке амплификатов рестриктазой.

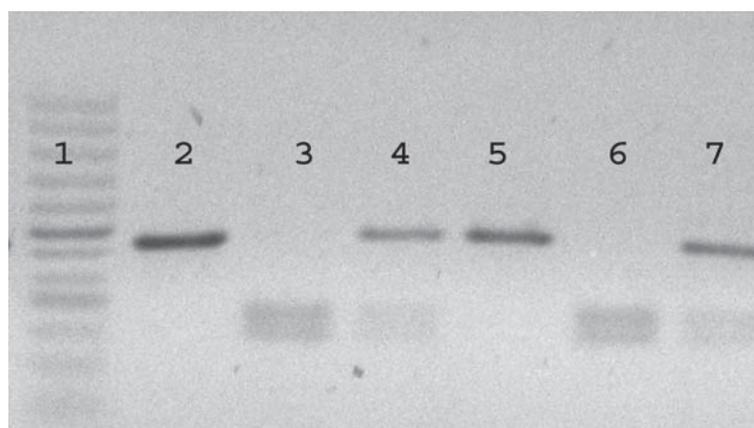
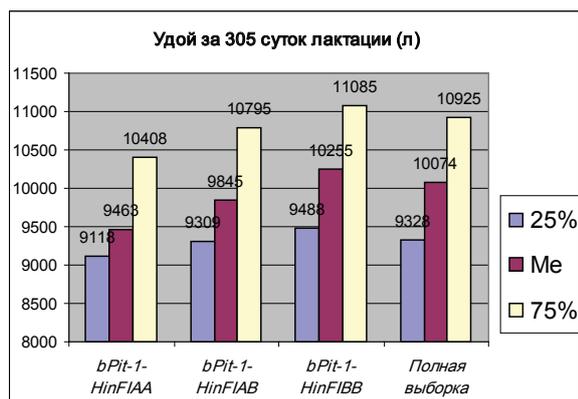


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ДНК-типирования *bPit-1-HinFI* -полиморфизма в 2% агарозном геле
Условные обозначения: 1 - маркер 50 br DNA Ladder (Fermentas); 2 - продукт амплификации;
3, 6 - генотип *bPit-1-HinFI^{BB}*; 4, 7 – генотип *bPit-1-HinFI^{AB}*; 5- генотип *bPit-1-HinFI^{AA}*

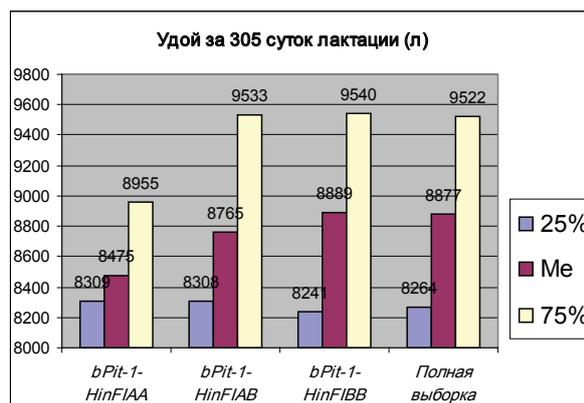
Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента проведено ДНК-типирование 109 особей голштинской и 302 особей черно-пестрой породы. Выявлены животные с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}*. Аллель *bPit-1-HinFI^A* в обеих выборках является более редким.

Исследование влияния генотипа по полиморфизму *HinFI* гена *bPit* на **общую продуктивность молока** за лактацию показало, что у коров обеих пород предпочтительным является аллель *bPit-1-HinFI^B* (рис. 2а, б).



2 а



2 б

Рис. 2. Показатели общей молочной продуктивности у коров с различными генотипами: 2а-голлштинская порода; 2б-черно-пестрая порода

У коров голштинской породы наблюдается возрастание значения медианы и интерквартильного размаха: 9463 (9118; 10408), 9845 (9309; 10795) и 10255 (9328; 10925) литра для животных с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* соответственно. Срединное значение медианы по выборке составляет 10074 литра, интерквартильный размах 9328; 10925, что значительно ниже по сравнению с группой животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}*. Среди коров черно-пестрой породы отмечается такая же тенденция: 8475 (8309-8955), 8765 (8308-9533) и 8877 (8264-9522) литра для животных с генотипами

bPit-1-HinFI^{AA}, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* соответственно, при среднем значении медианы выборки 8877 (8264; 9522) литра. То есть, в выборках обеих пород значение медианы в группах животных гомозиготных по предпочтительному аллелю *bPit-1-HinFI^B* выше, чем значения медиан для этих выборок в целом.

Результаты статистической оценки достоверности выявленных тенденций с помощью серийного критерия *r* Вальда-Вольфовица приведены в таблице 1 и подтверждают отличие групп животных с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* от выборки в целом.

Таблица 1

Результаты применения серийного критерия *r* Вальда-Вольфовица для сравнения групп коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* с выборкой в целом по признаку общего удоя

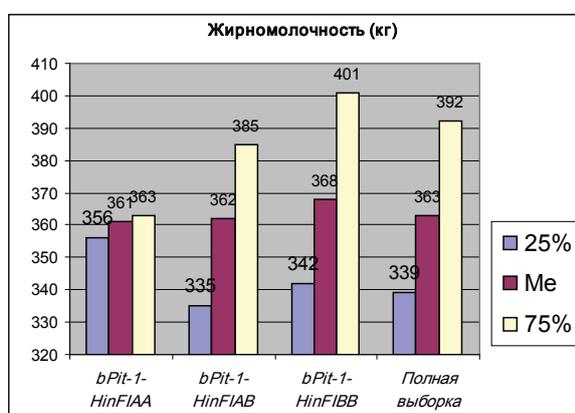
Порода	Генотип	<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>
Голштинская	Количество особей	5	36	68
	Значение <i>p</i> статистики*	0,60	0,00	0,00
Черно-пестрая	Количество особей	14	108	180
	Значение <i>p</i> статистики*	0,60	0,00	0,00

* Полученные данные статистически значимы при $p < 0,05$.

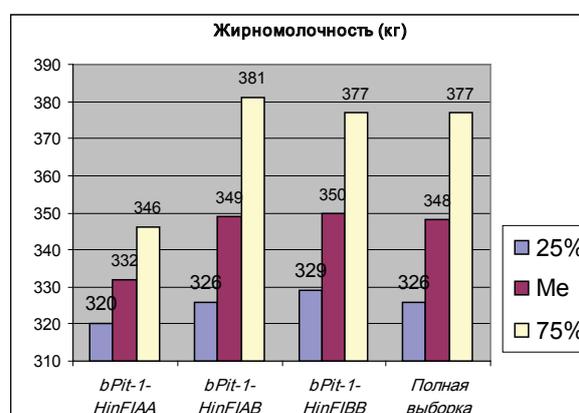
Исследование влияния генотипа на **жирномолочность** показало, что по этому признаку аллель *bPit-1-HinFI^B* также является предпочтительным у коров обеих пород.

Относительно влияния генотипа на показатель жирномолочности прослеживается тенденция, аналогичная отмеченной выше для общего удоя. В выборках обеих пород наблюдается возрастание этого показателя от животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* к группе с генотипом *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}*. Так среди коров голштинской породы значение медианы и интерквартильного размаха для всей выборки

составляет 363 (339; 392) кг. Значения медианы и интерквартильного размаха по этому параметру составляет 361 (356; 363), 362 (335; 385) и 368 (342; 401) кг для животных с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* соответственно. Среди коров черно-пестрой породы значения медиан и интерквартильного размаха составляют 332 (320; 346), 349 (326; 381) и 348 (326; 377) кг для животных с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* соответственно, при значении медианы и интерквартильного размаха для всей выборки 348 (326; 377) кг (рисунок 3а, б).



3а



3б

Рис. 3. Показатели жирномолочности у коров с различными генотипами: **3а**-голлштинская порода; **3б**-черно-пестрая порода

Несмотря на то, что уровни продуктивности молочного жира у коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* в некоторых случаях рознятся незначительно, результаты серийного критерия *r*

Вальда-Вольфовица подтверждают отличие распределения данного признака в группах коров с генотипом *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* от общей выборки у представителей обеих пород (табл. 2).

Таблица 2

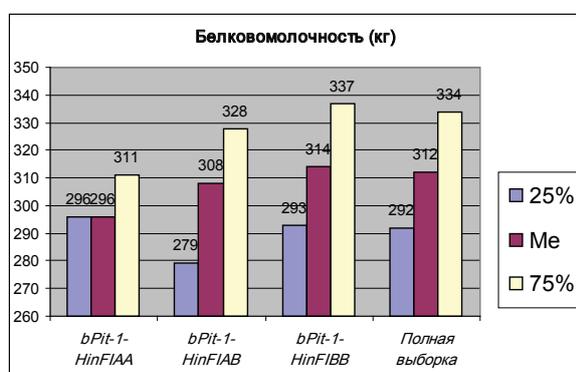
Результаты применения серийного критерия *r* Вальда-Вольфовица для сравнения групп коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* с выборкой в целом по признаку общего удоя

Порода	Генотип	<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>
Голштинская	Количество особей	5	36	68
	Значение <i>p</i> статистики*	0,60	0,00	0,00
Черно-пестрая	Количество особей	14	108	180
	Значение <i>p</i> статистики*	0,40	0,00	0,00

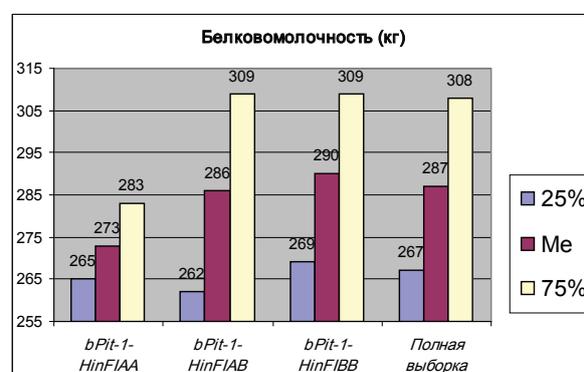
* Полученные данные статистически значимы при *p*<0,05.

Исследование влияния генотипа по *HinFI*-полиморфизму гена *bPit-1* на **белковомолочность** у коров голштинской и черно-пестрой пород показало, что по этому признаку, так же, как по признаку общей молочной продуктивности и жирномолочности, предпочтительным среди представителей обеих пород является наиболее распространенный аллель *bPit-1-HinFI^B*. В этом случае также наблюдается повышение показателя продуктивности от животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* к генотипу *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* у коров обеих исследуемых пород. Так, у коров голштинской породы срединное

значение белковомолочности по выборке в целом составляет 312 кг, интерквартильный размах 292; 334. Значение медиан и интерквартильный размах в группах коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* составляет 296 (296; 311), 303 (279; 328) и 314 (293; 337) соответственно. У коров черно-пестрой породы значение медиан и интерквартильный размах в группах коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* составляет 273 (265; 283), 286 (262; 309) и 290 (269; 309) соответственно, при срединном значении выборки в целом 287 (267; 308) (рис. 4 а, б).



4 а



4 б

Рис. 4. Показатели белковомолочности у коров с различными генотипами:
4 а - голштинская порода; 4 б - черно-пестрая порода

Как видно из диаграммы, в выборках обеих пород животные с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* демонстрируют более высокий уровень продуктивности молочного белка, по сравнению с группами животных с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{AA}*, и выборкой в целом.

Результаты применения серийного критерия *r* Вальда-Вольфовица для статистической оценки отмечаемых тенденций подтверждают отличие распределения данного признака в группах коров с генотипом *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* от такового в общей выборке у представителей обеих пород (табл. 3).

Таблица 3

Результаты применения серийного критерия *r* Вальда-Вольфовица для сравнения групп коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* с выборкой в целом по признаку общего удоя

Порода	Генотип	<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>
Голштинская	Количество особей	5	36	68
	Значение <i>p</i> статистики*	0,61	0,03	0,00
Черно-пестрая	Количество особей	14	108	180
	Значение <i>p</i> статистики*	0,40	0,00	0,00

* Полученные данные статистически значимы при $p < 0,05$.

В работе R. Renaville (1997 г) показано, что аллель *bPit-1-HinFI^A* ассоциирован с повышенной продуктивностью молока и молочного белка и более низким содержанием молочного жира у животных голштинско-фризской породы [5]. L. Zwierzchowski в 2002 году при изучении польского черно-пестрого скота также подтвердил наличие положительной ассоциации *bPit-1-HinFI^A* аллеля с ежедневной продуктивностью молока, однако содержание молочного жира в данном исследовании у животных – обладателей аллеля *bPit-1-HinFI^A* было также выше, чем у животных – носителей аллеля *bPit-1-HinFI^B*, по сравнению с данными Renaville [6]. В 2004 г. K. De Mattos выявил, что гетерозиготные *bPit-1-HinFI^{AB}* Гуг быки более предпочтительны по сравнению с *bPit-1-HinFI^{BB}* быками по молочной продуктивности их дочерей [7].

Эти отличия в эффекте данного полиморфизма у представителей различных пород позволяют предположить, что, возможно, с геном *bPit1* сцеплен другой функциональный локус, который собственно и влияет на молочную

продуктивность и который расположен в непосредственной близости от локуса *bPit-1-HinFI* [8]. Другим объяснением такого эффекта, по мнению M. Mukesh (2008), может служить присутствие дополнительного генетического фактора. Длительная дивергенция между *B. Indicus* и *B. Taurus* могла привести к возникновению некоторых геномных различий. Поэтому, возможно, что присутствие одинаковых аллелей отличается по физиологическому эффекту у различных пород [9].

В таком случае, применение данного полиморфизма в качестве генетического маркера по признакам молочной продуктивности требует дополнительных исследований по каждой породе. Однако, по данным, полученным нами для коров голштинской и черно-пестрой породы белорусского разведения, аллель *bPit-1-HinFI^B* положительно ассоциирован с такими признаками молочной продуктивности, как общий удой молока за 305 суток лактации, жирномолочность и белковомолочность, и может быть рекомендован в качестве генетического маркера.

Заключение

Исследование ассоциации полиморфизма *HinFI* гена *bPit* с признаками молочной продуктивности выявило общие тенденции для выборок коров как голштинской, так и черно-пестрой пород белорусского разведения:

1. У представителей обеих пород аллель *bPit-1-HinFI^B* является предпочтительным по трем исследуемым параметрам молочной продуктивности: удой за 305 суток лактации, жирномолочность и белковомолочность.

2. Также по трем исследуемым признакам молочной продуктивности животные с гено-

типом *bPit-1-HinFI^{BB}* превосходят гетерозиготы, а те, в свою очередь, особей с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}*.

3. У представителей обеих пород показатели продуктивности животных с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* по трем признакам превышают таковые по отношению ко всей выборке в целом.

Таким образом, аллель *bPit-1-HinFI^B* может быть рекомендован в качестве генетического маркера молочной продуктивности голштинской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота.

Список использованных источников

1. Woollard, J. Rapid communication: *HinFI*-polymorphism at the bovine *Pit1* locus / J. Woollard, C. B. Schmitz, A. E. Freeman, C. K. Tuggle // J. Anim. Sci. – 1994. – Vol. 72. – P. 3267.

2. Dierkes, B. Partial genomic structure of the bovine *Pit-1* gene and characterization of a *HinFI* transition polymorphisms in exon 6 / B. Dierkes, B. Kriegesmann, B. G. Baumgarthne, B. Breining

// Anim. Genet. – 1998. – Vol. 29. – P. 405.

3. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., МедиаСфера, 2002. 312 с.

4. Гублер, Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Ленинград, Медицина 1973. 142 с.

5. Renaville, R. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls / R. Renaville, N. Gengler, E. Vrech, A. Prandi, S. Massart, C. Corradini // *J. Dairy Sci.* – 1997. – Vol. 80, №12. – P. 3431 – 3438.

6. Zwierzchowski, L. 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, J. Krzyzewski, N. Strzalkowska, E. Siadkowska, A. Ryniewicz // *Anim. Sci. Pap. Rep.* – 2002. – Vol. 20. – P. 213–227.

7. De Mattos, K.K. Association of bGH and

Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls / K.K. De Mattos, S.N. Del Lama, M.L. Martinez, A. Freitas, F. Braz // *J. Agric. Res.* – 2004. – Vol. 39. – P. 147–150.

8. Edriss, V. Pit1Gene polymorphism of Holstein Cows in Isfahan Province / V. Edriss, H. R. Rahmani // *Biotechnology* – 2008. – Vol. 7, № 2. – P. 209–212.

9. Mukesh, M. Analysis of bovine pituitary specific transcription factor–HinF I gene polymorphism in Indian zebuine cattle / M. Mukesh, R.C. Sodhi, Sobti, B. Prakash, R.A. Kaushik, K. Aggarwal // *Livestock Science* – 2008. – Vol. 113. – P. 81–86.

Дата поступления статьи 29 ноября 2010 г.

РЕФЕРАТЫ

SUMMARIES

УДК 635.64: 631.523: 575.116.4

Сравнительный анализ полиморфизма микросателлитных маркеров генотипов томата (*Solanum lycopersicum* L.) белорусской и зарубежной селекции / В. Аджиева [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 7-11. Соавторы: Некрашевич Н.А., Малышев С.В., Бабак О.Г., Кильчевский А.В.

Проведен сравнительный анализ полиморфизма 13 генотипов томата белорусской, российской и нидерландской селекции с использованием 7 микросателлитных маркеров, расположенных в различных хромосомах томата. В целом, для образцов коллекции обнаружено 26 аллелей для семи SSR-маркеров. В зависимости от SSR-маркера, количество аллелей варьировало от 2 для TMS22 до 6 для Leef 1Aa. В среднем наблюдалось по 3.71 аллеля на locus, со средним значением индекса информационного содержания (PIC) 0,54. Выделена группа наиболее информативных SSR-маркеров, таких как Leef 1Aa, LEMDDNa, Ssr 63, Est 253712 и Tms 37. Для данных маркеров индекс PIC находится на уровне 0,82-0,53, что позволяет эффективно использовать их наряду с другими маркерами для идентификации сортов томата по микросателлитным локусам.

Ключевые слова: томат, микросателлитные маркеры, информативное содержание маркеров, Беларусь

Comparative analysis of polymorphism of microsatellite markers in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes of Belarusian and foreign breeding / V. Ajyieva [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 11. Minsk, 2010. P. 7-11. Nekrashevich N., Malyshev S., Babak O., Kilchevsky A.

Comparative analysis of polymorphism was carried out in 13 tomato genotypes of Belarusian, Russian and Dutch breeding using 7 microsatellite markers distributed uniformly over tomato chromosomes. On the whole, 26 alleles were detected for seven SSR-markers for the collection accessions. Depending on the SSR-marker, the number of alleles varied from 2 for TMS22 to 6 for Leef 1Aa. On the average, 3.71 alleles per locus were observed, with the mean value of PIC index being equal to 0.54. The group of the SSR-markers, showing the highest polymorphic information content index, such as Leef 1Aa, LEMDDNa, Ssr 63, Est 253712 and Tms 37., was selected. The PIC index for the given markers is at the level of 0.82-0.53 that makes it possible to use them effectively along with other markers for identifying tomato cultivars by microsatellite loci.

Key words: tomato, microsatellite markers, the informative content of markers, Belarus

УДК 633.52.577.21:632.165

Введение к-ДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{ssc} животного происхождения в растения рапса / А.М. Шишлова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С.12-19. Соавт.: Л.А.Сахно, Б.В. Моргун, Н.В. Кучук, Н.А. Картель.

Разработана эффективная технология трансформации сортов ярового рапса конструкцией, содержащей ген животного происхождения, выделенного из коры надпочечников быка - *CYP11A1*, а также маркерный ген *bar*. Ген *bar* позволяет вести селекцию трансформантов на фосфинотрицине. Ген *CYP11A1* кодирует белок цитохром P450_{ssc}, который является ключевым ферментом стероидогенеза в стероидогенных тканях животных. Включение гена *CYP11A1* в геном растений рапса подтверждено методом ПЦР анализа.

Ключевые слова: рапс, цитохром P450_{ssc}, трансгенные растения, кДНК *CYP11A1*, агробактериальная трансформация

Introduction of cytochrome P450_{ssc} *CYP11A1* cDNA of animal origin in rapeseed plants / A.M. Shishlova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 12-19. L.A. Sakhno, B.V. Morgun, N.V. Kuchuk, N.A.Kartel.

An effective technology of transforming spring rape varieties by the construction containing the gene of animal origin, isolated from bovine adrenal cortex - *CYP11A1*, as well as marker *bar* gene, was developed. *Bar* gene allows selection of transformants on phosphinotricin. *CYP11A1* gene encodes a cytochrome P450_{SSC} protein, which is a key enzyme of steroidogenesis in steroidogenic animal tissues. *CYP11A1* gene insertion into genome of rape plants was verified by PCR analysis.

Key words: rapeseed, cytochrome P450_{ssc}, transgenic plants, the cDNA *CYP11A1*, agrobacterial transformation

УДК 634.11:631.524.86

Урбанович, О.Ю. Распространение генов устойчивости к мучнистой росе в коллекции сортов и видов яблони, выращиваемых в Беларуси / О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная ге-

нетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 20-25.

В коллекционном материале сортов и видов яблони, выращиваемых в Беларуси, определяли присутствие генов устойчивости к мучнистой росе. С помощью молекулярных маркеров выявлены источники генов *Pl1*, *Pl2*, *Pl-w*. Отмечено, что гены устойчивости к мучнистой росе не получили широкого распространения среди коммерческих сортов яблони различного происхождения.

Ключевые слова: яблоня, мучнистая роса, молекулярные маркеры, гены устойчивости

Urbanovich, O.Yu. Spread of mildew resistance genes in the collection of apple cultivars and species grown in Belarus / O.Yu. Urbanovich, Z.A. Kazlovskaya, N.A. Kartel // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 20-25.

The presence of mildew resistance genes was determined in the collection material of apple cultivars and species grown in Belarus. Sources of genes *Pl1*, *Pl2*, *Pl-w* were revealed by molecular markers. It was noted that mildew resistance genes were not widely practiced among commercial apple cultivars of different origin.

Key words: apple, mildew, molecular markers, resistance genes

УДК 575.222.73:576.354.4

Создание генетической коллекции тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов и ее использование в цитогенетических исследованиях / Н.И. Дубовец [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11 Минск, 2010. С. 26-33. Соавт.: Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич, Л.Ф.Кабашникова, Г.Е. Савченко.

Представлены результаты многолетних исследований по созданию генетической коллекции тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов с различными вариантами рекомбинантного генома. Приведены примеры использования линейного материала в качестве модельных систем для цитогенетических исследований.

Ключевые слова: генетическая коллекция, тетраплоидные тритикале, дифференциальное окрашивание хромосом (С-бэндинг), фотосинтетические пигменты

Creation of genetic collection from tetraploid wheat-rye amphidiploids and its use in cytogenetic investigations / N.I. Dubovets [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 26-33. Ye.A. Sycheva, L.A. Solovey, T.I. Shtyk, Ye.B. Bondarevich, L.F. Kabashnikova, G.Y. Savchenko.

The article presents the results of long-term investigations for creating a genetic collection of tetraploid wheat-rye amphidiploids with different variants of recombinant genome. Examples of using a line material as model systems for cytogenetic research are given.

Key words: genetic collection, tetraploid triticale, differential staining of chromosomes (C-banding), photosynthetic pigments

УДК 575.1/2:616

Оценка состояния генома у потенциальных носителей мутаций, ответственных за синдромы хромосомной нестабильности / Савина Н.В [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 34-44. Соавт.: Смаль М.П., Кужир Т.Д., Хурс О.М., Егорова Т.М., Политыко А.Д., Гончарова Р.И.

Исследовано состояние генома у семи пациентов с предполагаемым диагнозом синдром хромосомной нестабильности (СХН) и 10 членов их семей с помощью цитогенетического анализа и разрабатываемой технологии диагностики геномной нестабильности, основанной на применении метода ДНК-комет. Частота aberrаций хромосом у пациентов с предполагаемыми диагнозами синдром Ниймеген (СН) и анемия Фанкони (АФ) значительно превосходила контрольный уровень. У пяти детей найдены сайт-специфические перестройки в хромосомах 7 и 14, подтверждающие СН. У этих же пациентов с помощью новой технологии обнаружена геномная нестабильность и впервые показано нарушение репарации окислительных повреждений ДНК. В группе родственников, то есть у потенциальных гетерозиготных носителей соответствующей мутации, оба подхода позволили выявить признаки дестабилизации генома. У одного пациента обнаружена гиперчувствительность хромосом к митомицину С, что служит диагностическим признаком АФ; у него же обнаружена повышенная реакция лимфоцитов на окислительный стресс *in vitro*. В целом, продемонстрировано соответствие данных при использовании обоих подходов, однако метод ДНК-комет в сочетании с оригинальным экспериментальным дизайном позволил охарактеризовать кинетику репарации ДНК и выявить различия в этом процессе при СН и АФ.

Ключевые слова: синдром Ниймеген (СН), анемия Фанкони (АФ), aberrации хромосом, повреждения ДНК, репарация ДНК, лимфоциты

Estimation of genome integrity in potential carriers of mutations responsible for chromosome instability syndromes / N.V. Savina [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 34-44. Smal M.P., Kuzhir T.D., Khurs O.M., Egorova T.M., Polityko A.D., Goncharova R.I.

Genomic integrity in seven patients suspected of Chromosome Instability Syndromes (CIS) and ten members of

their families was studied using both cytogenetic analysis and a novel technology for genome instability diagnostics based on applying the comet assay. The spontaneous frequencies of chromosome aberrations in patients suspected of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and Fanconi anemia (FA) significantly exceeded their levels in the control group of healthy individuals. In five patients, site-specific aberrations in chromosomes 7 and 14 were detected that confirmed the diagnosis of NBS. In the same patients, genome instability was found in the comet assay, as well as deficiency in repair of DNA oxidative damage was first shown. In the group of relatives, i.e. in potential heterozygous carriers of the NBS-related mutation, the features of genome destabilization were revealed using both approaches. The diagnosis of FA was cytogenetically verified in one patient due to chromosome hypersensitivity to a cross-linking agent mytomicin C. The higher susceptibility of his lymphocytes to oxidative stress was also found in vitro. On the whole, the estimates corresponded to each other in both approaches. However, the comet assay coupled with an original experimental design allowed us to characterize DNA repair kinetics and to demonstrate differences in this process between FA and NBS cells.

Key words: Nijmegen breakage syndrome (NBS), Fanconi anemia (FA), chromosome aberrations, DNA damage, DNA repair, lymphocytes

УДК 574.3:575.24/.25]:616.151.5(100)

Сравнение популяционных частот генетических факторов риска инфаркта миокарда с уровнями этого заболевания в разных странах европы / И.Б. Моссе [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 45-53. Соавт.: А.Л. Гончар, К.В. Жур, М.Д. Амелянович, П.М. Морозик.

Установлены популяционные частоты генетических факторов риска инфаркта миокарда (ИМ) – гомозигот по полиморфизмам 34Leu XIII-го фактора свертывания крови и 4G/4G гена PAI-1, а также мутации Factor V Leiden V-го фактора свертывания крови в популяции Беларуси. Проведено сравнение частот генотипов риска ИМ с уровнями этого заболевания в разных странах Европы. Выявлена достоверная положительная корреляционная зависимость между частотой заболеваемости ИМ и частотой генотипа 4G/4G. В то же время для частот генотипов и полиморфных аллелей Val34Leu XIII-го фактора свертывания крови и мутации Factor V Leiden V-го фактора свертывания крови достоверной корреляции с частотой возникновения ИМ не наблюдалось. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что генотип 4G/4G гена PAI-1 является наиболее информативным для определения генетической предрасположенности к ИМ.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, генные полиморфизмы, мутация Лейден, популяционные частоты, страны Европы

Comparison of population frequencies of myocardial infarction genetic risk factors with this disease levels in different European countries/ I.B. Mosse [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 45-53. A.L. Gonchar, K.V. Zhur, M.D. Ameliyanovich, P.M. Marozik.

Population frequencies of myocardial infarction (MI) genetic risk factors, such as homozygotes for 34 Leu polymorphism of the coagulation factor XIII, 4G/4G of PAI-1 gene and mutation of Factor V (Leiden) in Belarus population were established. The comparison of MI predisposition genotypes frequencies with the levels of this disease in different countries of Europe was performed. We revealed statistically significant positive correlation between the frequencies of MI morbidity and 4G/4G genotype. At the same time, there was no statistically significant correlation between frequencies of coagulation factor XIII Val34Leu polymorphic alleles and Factor V Leiden mutation and MI frequency. The obtained data allows conclusion that PAI-1 gene genotype 4G/4G is the most informative for evaluation of genetic predisposition to MI.

Key words: myocardial infarction, gene polymorphisms, population frequencies, Leiden mutation, European countries

УДК 631.523:575.116.4

Молекулярно-генетические исследования у люпина (*Lupinus L.*): создание молекулярных маркеров и генетических карт / В.С. Анохина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 54-67. Соавт.: Л.Н. Каминская, И.Б. Саук, С.В. Петрученя.

Представлен обзор научной литературы о создании молекулярных маркеров, сцепленных с генами, обуславливающими хозяйственно-ценные признаки люпина, для широкого их использования в селекционных программах в качестве надежных критериев (MAS - marker-assisted selection) идентификации и отбора желательных генотипов. Рассматриваются новые подходы к конструированию генетических карт люпина посредством молекулярных методов. Обсуждаются главная стратегия и проблемы, возникающие в процессе создания молекулярных маркеров.

Ключевые слова: люпин (*Lupinus L.*), молекулярные маркеры, генетические карты, молекулярная методика MFLP

Molecular-genetic investigations in *Lupinus L.*: Development of molecular markers and genetic maps / V. Anokhina [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 54-67. L. Kaminskaya, I. Sauk, S. Petruchenya.

A review of scientific literature information on development of molecular markers, linked with the genes defining economically valuable lupine traits and applicable to a wide range of crosses for marker assisted selection (MAS) in lupine plant breeding program is presented. New approaches to constructing lupine genetic maps with molecular technique MFLP

are also considered. The main strategy and problems arising during the molecular marker development are discussed.

Key words: *Lupinus L.*, molecular markers, genetic maps, molecular technique MFLP

УДК: 631.524.86:632.4:633.111

Булойчик, А.А. Частота встречаемости генов вирулентности в белорусских популяциях *Puccinia triticina* Erikss. / А.А. Булойчик, В.С. Борзяк, Е.А. Волуевич // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 68-73.

Популяции возбудителя грибной болезни мягкой пшеницы – бурой ржавчины (*Puccinia triticina* Erikss.) были собраны на посевах генетических коллекций мягкой пшеницы на БОС ИГЦ (Минский район) и на селекционных посевах на Экспериментальной базе «Зазерье» (Пуховичский район). Из них выделили 186 и 212 моноизолятов патогена соответственно. Оценили генотипический состав популяций по признаку вирулентности с использованием изогенных линий и сортов мягкой пшеницы с известными генами устойчивости к этому патогену. На основании данных о частоте изученных генов вирулентности в популяции патогена можно сделать вывод об эффективности генов устойчивости пшеницы к возбудителю бурой ржавчины на территории Беларуси. Гены устойчивости пшеницы Lr9 и Lr19 обеспечивают резистентность более, чем к 97% изолятов возбудителя бурой ржавчины. В связи с этим данные гены можно считать высокоэффективным для использования в селекции на иммунитет. В ближайшие годы они смогут обуславливать устойчивость пшеницы к большинству клонов возбудителя болезни.

Ключевые слова: пшеница, бурая ржавчина, устойчивость, гены вирулентности

Buloichik, A.A. The occurrence frequency of virulence genes in Belarusian *Puccinia triticina* Erikss. populations // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 68-73. A.A. Buloichik, B.S. Borzyak, E.A. Voluevich

Populations of common wheat fungal disease pathogen - brown rust (*Puccinia triticina* Erikss.) were gathered from crops of common wheat genetic collections at the Biological Experimental Station of the Institute of Genetics and Cytology (Minsk region) and from selection crops at the Experimental Station “Zazerie” (Pukhovichi region). Out of them 186 and 212 pathogen monoisolates, respectively, were selected. A genotypic composition of the populations was evaluated for the virulence trait using isogenic lines and common wheat cultivars with known genes of resistance to this pathogen. Based on the data on the frequency of the studied virulence genes in the pathogen population, one can draw a conclusion on the efficiency of wheat resistance genes to brown rust pathogen in the area of Belarus. Wheat resistance genes Lr9 and Lr19 ensure resistance to more than 97% of brown rust pathogen isolates. In this connection the above genes can be considered high effective for use in breeding for immunity. In the nearest future they can give rise to the majority of disease pathogen clones.

Kew words: wheat, brown rust, resistance, virulence genes

УДК 577.21:796

Генетические маркеры устойчивости организма к гипоксии / И.Б. Моссе [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 74-82. Соавт.: А.Л. Гончар, Л. В. Кухтинская, Н.И. Моссе, П.Н. Малашевич, А.В. Семеняков.

С целью выявления генетических факторов, обуславливающих наиболее высокую способность адаптации к гипоксии, проведено исследование ДНК членов Национальной олимпийской сборной команды Беларуси по биатлону. Выполнен молекулярно-генетический анализ 12 полиморфизмов 9 генов (HIF1A, ACE, eNOS, EPO, BDKRB2, PAI-1, VEGF, ENDT, MB). Показано, что частоты аллельных вариантов, определяющих повышенную функциональную активность ряда генов, у биатлонистов высшей квалификации превышают средние показатели, характерные для лиц, не занимающихся спортом профессионально, что подтверждает наличие у данных спортсменов генетической составляющей устойчивости к гипоксии, необходимой для достижения высоких спортивных показателей. Выявление отдельных неблагоприятных генных вариантов у представителей сборной команды дает возможность корректировки соответствующих эффектов с помощью индивидуального медико-биологического обеспечения.

Ключевые слова: устойчивость к гипоксии, спорт, биатлонисты высшей квалификации, ДНК – тестирование

Genetic markers of organism resistance to hypoxia / I.B. Mosse [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 74-82. A.L. Gonchar. L.V. Kukhtinskaya, N.I. Mosse, P.H. Malashevich, A.V. Semenyakov.

DNA of the members from the National Olympic biathlon team of Belarus was studied for revealing genetic factors giving rise to the highest adaptation ability to hypoxia. Molecular – genetic analysis of 12 polymorphisms in 9 genes (HIF1A, ACE, eNOS, EPO, BDKRB2, PAI-1, VEGF, ENDT, MB) was made. The frequencies of allelic variants defining increased functional activity of some genes in high-skill biathlonists were shown to exceed mean values, typical for the persons not playing sport. This corroborates the presence in these sportsmen of a genetic hypoxia resistance component which is required for attainment of high sports values. Detection of some unfavorable gene variants in representatives of

the Olympic biathlon team makes it possible to correct proper negative effects by means of individual medico-biological provision.

Key words: Hypoxia resistance, sport, high-skill biathlons, DNA-testing

УДК 575.116.4

Интенсивность и распределение рекомбинационных событий в области главного комплекса гистосовместимости у человека / Т. А. Шарапова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 83-91 / Соавт.: Т. Линник, И. Барская, О.Ю. Верлинский, С.М. Речитская.

В данной работе представлено изучение частоты и распределения генетической рекомбинации внутри главного комплекса гистосовместимости (МНС) с использованием данных предимплантационного HLA генотипирования, включающих информацию о мужских и женских мейозах. Материалом для исследования являлись единичные бластомеры, удаленные из предимплантационных эмбрионов, принадлежащих 110 супружеским парам, нуждающимся в подборе донора для лечения больного ребенка. STR-генотипирование МНС области проводилось методом мультиплексной двухступенчатой ПЦР с вложенными праймерами. В результате изучения 787 мужских и 1839 женских мейозов было выявлено соответственно 33 и 50 рекомбинантных хромосом. Средняя интенсивность рекомбинации внутри исследованного фрагмента составила 0.37сМ/Мб для мужчин и 0.53сМ/Мб для женщин. Соотношение интенсивности рекомбинации у мужчин и женщин составляет 1:1.5. У женщин для 6, а у мужчин для 4 сегментов было обнаружено увеличение рекомбинационной активности по сравнению со средним значением в 1,6-5 раз. Для сегмента D6S1629-D6S1568 получено статистически значимое увеличение уровня рекомбинации по сравнению со средним ($P < 0.05$), что достоверно указывает на присутствие горячей точки рекомбинации размером 268 т.п.о. в прилегающей к МНС области.

Ключевые слова: МНС область, интенсивность рекомбинации, распределение горячих точек, STR маркеры, мейозы мужских и женских половых клеток

Recombination Intensity and Hot Spot Distribution across Major Histocompatibility Complex / Sharapova T. [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P.----. Т. Linnik, I. Barskaya, O. Verlinsky, S. Rechitskaya.

We present estimation of recombination rate and hotspot distribution within MHC region based on the analysis of preimplantation HLA genotyping data comprising both male and female meioses. Preimplantation genotyping has been performed for 110 couples in a need of HLA matching stem cell donor for an affected sibling. STR genotyping of MHC region has been performed in single blastomeres using nested multiplex PCR. In total 1787 male and 1930 female meioses have been studied resulting in the identification and mapping of 33 and 50 recombinant chromosomes respectively. The estimated comprehensive recombination intensity within 5.4Mb segment was 0.37cM/Mb for males and 0.53cM/Mb for females with female: male ratio of 1:1.5. In females 6 and in males 4 segments located within HLA class II region displayed a 1.6-4.8 fold increase in recombination activity compared to the average rate. One segment D6S1629 to D6S1568 showed a significantly higher recombination intensity ($P < 0.05$) indicating the presence of a novel hotspot of 268kb adjacent to HLA class II region.

Key words: MHC region, recombination rate, hotspot distribution, STR markers, male and female meioses

УДК 636.2.082.22

Внутрипородный анализ генетической структуры популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада / Е.В. Белая [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 92-98. Соавт.: М.Е. Михайлова, Н.М. Волчок, Н.И. Тиханович.

Исследована генетическая структура трех популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения по полиморфным вариантам ключевых генов соматотропинового каскада. Изучены *HinF1*- 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*. Выявлены наиболее редкие и наиболее распространенные аллели в каждой паре исследуемых полиморфизмов. Выявлены внутрипородные различия распределения относительных частот аллельных вариантов для гена гипофизарного фактора *bPit-1* по *HinF1*- и *bPit-1-StuI*-полиморфизмам, а также для *AluI*-полиморфизма гена гормона роста *bGH*. По этим парам аллельных вариантов обнаружено отклонение распределения частот генотипов от теоретически ожидаемого равновесного распределения Харди-Вайнберга.

Ключевые слова. Гипофизарный фактор роста-1, гормон роста, рецептор гормона роста, инсулиноподобный фактор роста-1, пролактин

Intrabreed analysis of genetic structure in black-and white cattle populations of Belarusian breeding for polymorphic gene variants of somatotropin cascade / Ye.V. Belaya [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 92-98. M.E. Mikhailova, N.M. Volchok, N.I. Tikhonovich.

A genetic structure of three black-and white cattle populations of Belarusian breeding was investigated for polymorphic variants of key genes of somatotropin cascade.

HinFI- and *StuI*-gene polymorphisms of the hypophysial factor-1 *bPit-1*, *RsaI*-gene polymorphism of prolactin *bPrI*, *AluI*-gene polymorphism of growth hormone *bGH*, *SspI*-gene polymorphism of growth hormone receptor *bGHR* and *SnaBI*-gene polymorphism of insulin-like growth factor-1 *bIGF-1* were studied. The rare and widespread alleles were revealed in every pair of the polymorphisms studied. Intra-breed differences in distribution of relative allelic variant frequencies for the hypophysial factor *bPit-1* gene were detected for *HinFI*- and *bPit-1-StuI*-polymorphisms as well as for *AluI*-gene polymorphism of growth hormone *bGH*. Deviation of genotype frequency distribution from theoretically expected Hardy-Weinberg balanced distribution was found in these pairs of the allelic variants.

Key words: Hypophysial growth factor-1, growth hormone, growth hormone receptor, insulin-like growth factor-1, prolactin

УДК 636.2.082.22

М.Е. Михайлова / Оценка генетической структуры популяции *Bison bonasus* Linnaeus, полученная при сравнении двух методов генетико-популяционного анализа: ISSR-фингерпринтинга и RAPD-анализа / М.Е. Михайлова, Ю.В. Медведева, Г.Е. Сулимова // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 99-110.

Впервые в Беларуси проведен комплексный молекулярно-генетический анализ современного состояния микропопуляций беловежского зубра. Показано, что беловежский подвид зубра (*B. Bonasus bonasus*) уступает как кавказскому зубру, так и бизону по таким параметрам как: доля полиморфных локусов, среднее число фрагментов генома на особь, частота встречаемости фрагментов, что доказывает обедненность генофонда беловежского зубра. Рассчитаны сводные оценки парных различий генетических расстояний и их ошибок и средняя гетерозиготность исследованных локусов, полученные на основе ISSR и RAPD анализов. Кластерный анализ (UPGMA-анализ) показал, что популяция беловежского зубра достоверно образует два достаточно удаленных друг от друга кластера, что указывает на наличие генетически изолированных групп в пределах белорусской популяции *B. bonasus*.

Ключевые слова: беловежский зубр, ДНК-паттерны, полиморфизм, амплификация, праймеры, ISSR-, RAPD-анализ, фингерпринтинг, частота аллелей, генетические дистанции

M.E. Mikhailova / Estimation of a genetic structure of *Bison bonasus* Linnaeus population obtained by comparing two methods of genetic- population analysis: ISSR-fingerprinting and RAPD-analysis // M.E. Mikhailova, Yu. V. Medvedeva, G.E. Sulimova // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 99-110.

A complex molecular-genetic analysis of the present state of Belovezhsky bison micropopulations was made for the first time in Belarus. Belovezhsky bison subspecies (*B.bonasus bonasus*) was shown to be inferior to both Caucasian aurochs and bison in such parameters as share of polymorphic loci, mean number of genome fragments per individual, occurrence frequency of fragments that demonstrates scantiness of the Belovezhsky bison gene pool. Summary estimates of pair differences in genetic distances and their errors and mean heterozygosity of the studied loci, obtained on the basis of ISSR and RAPD analyses, were calculated. Cluster analysis (UPGMA-analysis) has shown that the Belovezhsky bison population forms two rather remote clusters indicating the existence of genetically isolated groups within the Belarusian *B.bonasus* population.

Key words: Belovezhsky bison, DNA-patterns, polymorphism, amplification, primers, ISSR-, RAPD-analyses, fingerprinting, allele frequency, genetic distances

УДК 575.222.73:576.354.4

Создание коллекции хромосомно-замещенных линий гексаплоидных тритикале и ее использование в практической селекции и цитогенетических исследованиях / Н.И. Дубовец [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 11. Минск, 2010. С. 111-119. Соавт.: Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич, И.Г. Адонина, Е.А. Салина, Л.Ф. Кабашникова, Г.Е. Савченко, Л.М. Абрамчик.

Представлены результаты многолетних исследований по созданию генетической коллекции хромосомно-замещенных линий гексаплоидных тритикале. Приведены примеры использования линейного материала в практической селекции и цитогенетических исследованиях.

Ключевые слова: генетическая коллекция, гексаплоидные тритикале, хромосомно-замещенные линии, интрогрессия хромосом D-генома пшеницы, дифференциальное окрашивание хромосом (С-бэндинг), FISH, GISH

Creation of genetic collection of hexaploid triticale chromosome-substitution lines and its use in practical breeding and cytogenetic investigations / N.I. Dubovets [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol.11. Minsk, 2010. P. 111-119. Y.A. Sycheva, L.A. Solovey, T.I. Shtyk, Y.B. Bondarevich, I.G. Adonina, Y.A. Salina, L.F. Kabashnikova, G.Y. Savchenko, L.M. Abramchik.

The article presents the results of long-term investigations for creating a genetic collection of hexaploid triticale

chromosome-substitution lines. The examples are given for using the line material in practical breeding and cytogenetic investigations.

Key words: genetic collection, hexaploid triticale, chromosome-substitution lines, introgression of wheat D-genome chromosomes, differential staining of chromosomes (C-banding), FISH, GISH

УДК577.21:636.23.082.2

М.Е. Михайлова, Е.В. Белая / Влияние *HinFI*-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста *bPit-1* на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской и белорусской черно-пестрой пород. / *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. Vol.11. Minsk, 2010. P. 120-126.

Исследовано влияние *bPit-1-HinFI*-полиморфизма, гена гипофизарного фактора роста на признаки молочной продуктивности у голштинского и черно-пестрого скота. Выявлены животные с генотипами *bPit-1-HinFIAA*, *bPit-1-HinFIAB* и *bPit-1-HinFIBB*. Показано, что в обеих выборках аллель *bPit-1-HinFIA* в обеих выборках является более редким. У представителей обеих пород аллель *bPit-1-HinFIB* является предпочтительным по трем исследуемым параметрам молочной продуктивности: удой за 305 суток лактации, жирномолочность и белково-молочность. У представителей обеих пород показатели продуктивности у животных с генотипом *bPit-1-HinFIBB* по этим признакам превышают таковые по отношению ко всей выборке в целом.

Ключевые слова: Гипофизарный фактор роста-1, генетический маркер, ген-кандидат, полиморфизм, молочная продуктивность

The Influence of *HinFI*-polymorphism of hypophysial growth factor gene *bPit-1* on milk productivity traits in cattle of Holstein and Belarusian black-and-white breeds. *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. Vol.11. Minsk, 2010. P. 120-126.

M.E. Mikhailova, E.V. Belaya / The influence of *bPit-1-HinFI*-polymorphism of hypophysial growth factor gene on milk productivity traits was studied in Holstein and black-and-white cattle. Animals with the genotypes *bPit-1-HinFIAA*, *bPit-1-HinFIAB* and *bPit-1-HinFIBB* were revealed. The *bPit-1-HinFIA* allele was shown to occur more rarely in both samples. The *bPit-1-HinFIB* allele is preferable in representatives of both breeds for the three milk productivity parameters under study: yield of milk over 305 days of lactation, fat and protein content in milk. Milk productivity values in animals with the genotype *bPit-1-HinFIBB* for these traits exceed those for the total sample on the whole in the representatives of both breeds.

Key words: hypophysial growth factor-1, genetic marker, candidate-gene, polymorphism, milk productivity

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 (297x210 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 , ϵ) производится только через опцию «Вставка\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 А4. 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 11

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*
Переводчик *Г.А. Мартысь*
Верстка *Е.П. Нестерович*
Технический редактор *В.Г. Гавриленко*

Подписано в печать 09.12.2010. Формат 60x84 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».