

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 12**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2011

УДК [577.21 + 575] (082)

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, 2011. — 154 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.

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

Редакционная коллегия:

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

УДК [577.21 + 575] (082)

ISSN 1999-9127

ISBN 978-985-442-581-8

ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси», 2011

СОДЕРЖАНИЕ

<i>В.А. Кунах</i> Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений	7
<i>А.Ф. Стельмах, В.И. Файт</i> Разнообразие генотипов современных сортов озимой мягкой пшеницы по потребности в яровизации и фоточувствительности.....	15
<i>Г.Е. Сулимова, Н.В. Кол, М.Н. Рузина, К.Ю. Столповский, В.Н. Воронкова, И.С. Бояринцева, Ю.А. Столповский</i> Разработка универсального метода оценки генетического разнообразия и паспортизации пород и популяций domesticiрованных видов животных.....	19
<i>А.М. Свирцевская, Л.В. Милько, А.В. Кильчевский</i> Анализ RAPD спектров сахарной свеклы (<i>Beta vulgaris</i> L.) и оценка возможностей использования метода для идентификации ее форм	28
<i>Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш</i> Создание и анализ генетически модифицированных растений льна (<i>Linum usitatissimum</i> L.), несущих мутантный ген тубулина, методом агробактериальной трансформации.....	41
<i>Д.В. Савчин, А.С. Панюш, Н.А. Картель</i> Генетическая трансформация растений векторными конструкциями с геном <i>gox Penicillium funiculosum</i>	49
<i>О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская, В.В. Васеха, П.В. Кузмицкая, Н.А. Картель</i> Идентификация гена <i>Va1</i> среди сортов и образцов яблони различного генетического происхождения, выращиваемых в Беларуси	56
<i>Н.В. Савина, М.П. Смаль, О.П. Романюк, Т.Д. Кужир, Р.И. Гончарова</i> Полиморфизмы генов эксцизионной репарации ДНК при раке мочевого пузыря	64
<i>Д.П. Бажанов, К.К. Яцевич</i> Типирование флуоресцирующих псевдомонад с помощью рестрикционного анализа межгенного 16S–23S рРНК спейсера.....	75
<i>М.А. Вишнякова, М.О. Бурляева, Т.В. Буравцева, Д.В. Соболев, Н.В. Алпатьева</i> Выявление генетического разнообразия коллекции зернобобовых ВИР посредством RAPD-маркирования образцов.....	80
<i>Ю.М. Борисов, В.Н. Бахарев, Е.В. Черепанова, А.М. Спрингер, А.П. Каштальян, З.З. Борисова, С.М. Мижуй, В.Н. Орлов</i> Полиморфизм хромосомных рас обыкновенной бурозубки (<i>Sorex araneus</i> , Insectivora) Беларуси	90

<i>Н.В. Луханина, М.Г. Синявская, И.М. Голоенко, А.А. Поморцев, О.Г. Давыденко</i> Полиморфизм хлоропластных локусов ячменя из центров генетического разнообразия.....	100
<i>М.Е. Михайлова, Е.В. Белая, Н.М. Волчок</i> Сравнительный анализ генетической структуры белорусских популяций крупного рогатого скота черно-пестрой и голштинской пород по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада (<i>bPit-1, bPrl, bGH, bGHR, bIGF-1</i>).....	108
<i>М.Е. Михайлова, Н.М. Волчок, Норис Роа, Карин Дрешер</i> Взаимосвязь признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота с (-1689) полиморфизмом гена альфа-лактальбумина (<i>α-LA</i>)	115
<i>А.С. Сапун, О.В. Квитко, И.И. Конева, Я.И. Шейко, Н.А. Балащенко, С.Е. Дромашко</i> Иммортализация и онкотрансформация в популяциях соматических клеток.....	119
<i>Е.В. Исаенко, И.Н. Бердичевец, Т.В. Манешина, Н.А. Картель</i> Стабильность наследования векторных конструкций с геном <i>сгу3аМ</i> в трансгенных растениях картофеля.....	130
<i>О.В. Квитко, И.И. Конева, Я.И. Шейко, А.С. Сапун, Н.А. Балащенко, С.Е. Дромашко</i> Эпигенетическое омоложение клеток и регенеративная медицина.....	136
Рефераты.....	146
Правила оформления статьи.....	154

CONTENTS

<i>V. Kunakh</i> Genome plasticity of somatic cells and plant adaptability	7
<i>A. Stelmakh, V. Fayt</i> Variety of genes of modern winter bread wheat cultivars for requirement in vernalization and photosensitivity.....	15
<i>G. Sulimova, N. Kol, M. Rusina, K. Stolpovsky, V. Voronkova, I. Boyarintseva, Yu. Stolpovsky</i> Development of the universal method for estimation of genetic diversity and certification of domesticated animal species and populations	19
<i>A. Svirshchevskaya, L. Milko, A. Kilchevsky</i> Sugar beet (<i>Beta vulgaris</i> L.) RAPD spectra analysis and assessment of possibilities to utilize the method for germplasm identification.....	28
<i>Ye. Guzenko, V. Lemesh</i> Development and analysis of genetically modified flax plants (<i>Linum usitatissimum</i> L.) carrying mutant tubulin gene by agrobacterial transformation method	41
<i>D. Sauchyn, A. Panyush, N. Kartel</i> Plant genetic transformation using vectors with <i>Penicillium funiculosum</i> <i>gox</i> gene	49
<i>O. Urbanovich, Z. Kozlovskaya, V. Vaseha, P. Kuzmitskaya, N. Kartel</i> Identification of gene <i>Val</i> among apple cultivars and accessions of different genetic origin grown in Belarus.....	56
<i>N. Savina, M. Smal, O. Ramaniuk, T. Kuzhir, R. Goncharova</i> Polymorphisms of DNA excision repair genes in bladder cancer	64
<i>D. Bazhanov, K. Yatsevich</i> Typing of fluorescent pseudomonads by restriction analysis of the intergenic 16S-23S rRNA spacer.....	75
<i>M. Vishnyakova, M. Burlyaeva, T. Buravtseva, D. Sobolev, N. Alpatyeva</i> Detection of genetic diversity in the collection of grain legumes of Vavilov Institute by means of RAPD-marking of accessions	80
<i>Yu. Borisov, V. Bakharev, E. Cherepanova, A. Springer, A. Kashtal'an, Z. Borisova, S. Mizhuy, V. Orlov</i> Polymorphism of chromosome races in common shrew (<i>Sorex araneus</i> , Insectivora) in Belarus.....	90

<i>N. Lukhanina, M. Siniauskaya, I. Goloenko, A. Pomortsev, O. Davydenko</i> Polymorphism of barley chloroplast loci from the genetic diversity centres	100
<i>M. Mikhailova, Ye. Belaya, N. Volchok</i> Comparative analysis of genetic structure in Belarusian populations of White-and-black and Holstein cattle for popymorphic gene variants of somatotropin cascade (<i>bPit-1, bPr1, bGH, bGHR, BIGF-1</i>)	108
<i>M. Mikhailova, N. Volchok, Noris Roa, Karin Dresher</i> Relationship between milk productivity traits of cattle and (-1689) polymorphism of alpha-lactalbumin (α - <i>LA</i>) gene	115
<i>A. Sapun, O. Kvitko, I. Koneva, Ya. Sheiko, N. Balashenko, S. Dromashko</i> Immortalization and oncotransformation in somatic cell population	119
<i>E. Isayenko, I. Berdichevets, T. Maneshina, N. Kartel</i> Stability of inheriting vector constructions with gene <i>cry3aM</i> in transgenic potato plants	130
<i>O. Kvitko, I. Koneva, Ya. Sheiko, A. Sapun, N. Balashenko, S. Dromashko</i> Epigenetic cell rejuvenation and regenerative medicine	136
Summaries	146
Instructions to authors	154

ПЛАСТИЧНОСТЬ ГЕНОМА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И АДАПТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина, 03627, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Высшие растения являются прикрепленными организмами, они не могут изменить место своего произрастания даже в случае самых неблагоприятных изменений окружающей среды. Очевидно, поэтому у них выработались мощные механизмы защиты от воздействия стрессовых факторов, действующих как на организменном, так и на популяционном уровне. В ответ на неблагоприятные флуктуации экологических факторов (засуха, затопление, экстремальная температура, засоление, острый недостаток или избыток некоторых макро- или микроэлементов, неблагоприятное освещение, инфицирование патогенами, механические повреждения и др.) в растениях происходят структурные и метаболические перестройки, которые препятствуют стрессу. Различные стрессорные сигналы изменяют генную экспрессию в направлении индуцирования или угнетения синтеза специфических метаболитов, прежде всего белков – структурных или ферментов специфических метаболических путей (см. например, /1-5/).

Одним из главных механизмов защиты растений от воздействия стрессовых факторов является, по нашему мнению, высокая пластичность генома соматических клеток в онтогенезе. Это обуславливает тотипотентность (переключение морфогенетических программ с целью восстановления поврежденных органов или организма в целом) и регулируемую (адаптивную) изменчивость генома в онтогенезе (в том числе появление генотрофов), а также высокую частоту, на первый взгляд, ненаправленных геномных изменений в условиях воздействий, которые выходят за пределы нормы реакции генотипа (/2/, раздел 4).

В течение онтогенеза в соматических клетках растений выявлены разные типы геномной изменчивости, само наличие и степень проявления которых зависит как от воздействия разных факторов окружающей среды (условий

произрастания), так и от генотипа растения. Такие изменения, по нашему мнению, следует считать эпигеномной (модификационной) изменчивостью, поскольку они являются обратимыми (см. ниже) и, очевидно, не затрагивают генетического кода. Это, в частности:

- удвоение и дальнейшая мультипликация ядерного генома;
- изменение количества хромосом и разных повторяющихся последовательностей ДНК;
- изменения в метилировании оснований ДНК;
- изменения, связанные с особенностями структурной упаковки ДНК в виде петлевых доменов хроматина и др.

Геномная изменчивость соматических клеток является результатом программы дифференцировки. Поэтому полиплоидизация клеток в онтогенезе – это следствие нарастающей специализации и резкого усиления специфических синтезов в процессе реализации программы развития. При этом дифференциальная репликация ДНК (амплификация) и недорепликация нарушают равновесие между генами и контролируемыми последовательностями, что может вызвать формирование новых соотношений между активностями разных генов. Однако значение эндополиплоидии заключается не только в специализации функций клеток, поддерживаемой состоянием эндополиплоидии, но и, что особенно важно, в том, что в подобном состоянии клетки приобретают характерные особенности, отсутствующие у диплоидных клеток. Наличие таких особенностей создает новые предпосылки и возможности для развития и действия факторов естественного отбора как на уровне организмов, так и на клеточном (внутриорганизменном) уровне.

Онтогенетическая полиплоидия (изменение количества ядерной ДНК) является, очевидно,

запрограммированным эпигеномным изменением, которое регулируется как внешними (свет, температура, наличие питательных веществ и т.п.), так и внутренними факторами. Полиплоидия вызывает каскад других как генетических, так и эпигенетических изменений. Например, при плоидизации генома активируются ретротранспозоны, одним из следствий чего могут быть множественные дубликации, возникают парамутагенные - парамутабельные взаимоотношения между аллелями; может изменяться способ размножения; изменяется структура всего генома и экспрессия генов и т.п. (см. /2/, раздел 4.1).

Существенным в стратегии адаптивности растений является то, что у них репродуктивные органы закладываются, как правило, на сравнительно поздних этапах онтогенеза, после десятков и сотен последовательных клеточных делений соматических клеток.

У растений репродуктивная система включает совокупность генов, детерминирующих:

- развитие дифференцированных структур цветка и формирования микро- и мегаспор;
- контроль и регуляцию двойного оплодотворения;
- индукцию эмбриогенеза;
- процесс развития семян.

Но не только вышеперечисленная совокупность генов определяет репродуктивную систему вида, отдельной популяции растений. Сложная иерархичность строения растительных популяций и самих растений является дополнительным источником генетической изменчивости, который предопределяет вариации в репродуктивной стратегии растений. В частности, упомянутая выше изменчивость в популяциях соматических клеток сопровождается изменчивостью в популяциях генеративных клеток: одновременно с клетками с гаметическим числом хромосом встречаются клетки с измененным, часто с соматическим числом хромосом. Миксоплоидия (полисоматия) в популяциях генеративных клеток модифицирует репродуктивные признаки растения, создавая предпосылки для размножения растений как половым, так и неполовым путем. Таким образом, изменчивость генома в популяциях соматических и генеративных клеток, происходящая в процессе онтогенетического

развития, является источником изменчивости в репродуктивной системе растений. В частности, онтогенетические вариации числа хромосом в соматических клетках (миксоплоидия) способны влиять на репродуктивные свойства растений и позволяют им переходить в случае необходимости в определенных условиях от половой репродукции к партеногенезу или от вегетативного размножения к половой репродукции, как это продемонстрировано на примере сахарной свеклы, капусты, земляники и др.

Обратимость упомянутых изменений генома, свойственных клеткам преимущественно в специализированном (дифференцированном) состоянии, четко проявляется при индукции дедифференцировки и каллусообразования. В частности, при индукции дедифференцировки клеток (и редифференцировки) как *in vivo*, так и *in vitro* до и во время первых митозов чаще всего происходят следующие процессы:

- дополнительный, часто довольно значительный синтез ДНК;
- амплификация отдельных последовательностей;
- эндоредупликация, другие формы эндомитоза;
- экструзия (выбрасывание ядерного материала за пределы клетки);
- цитомиксис;
- диминуция хроматина;
- потеря тканеспецифических В-хромосом;
- фрагментация ядер (амитоз);
- аномалии митоза и цитокинеза, в частности, образование синцитиев;
- слияние ядер в многоядерных клетках;
- образование микроядер при отсутствии аберрантных анафаз;
- сегрегация ядерного материала в профазе и метафазах не только полиплоидных, но и диплоидных клеток, которая приводит к редукции числа хромосом;
- соматический мейоз и кроссинговер и др.

По нашему мнению, способность к такому ответу, в ряде случаев приводящему геном клеточных ядер исходных дифференцированных и высокоспециализированных клеток в «дифференцированное» состояние (в состояние ядерного генома, характерное для стволовых клеток), лежит в основе свойственного многим растениям цикла развития

дифференцировка – дедифференцировка – редифференцировка. Детально эти вопросы рассмотрены и обсуждены в монографии (/2/, разделы 4-7, а также в статьях /6-9/).

Существенное влияние на геномную изменчивость оказывают внешние факторы. Усиление геномной изменчивости на организменном, хромосомном и молекулярном уровнях характерно в случае изменения (особенно резкого ухудшения) условий роста: при пониженной и повышенной температурах, засолении, повышенных дозах минеральных удобрений, неблагоприятных соотношениях минеральных питательных веществ или их дефиците, засухе, высушивании семян, вирусном, бактериальном заражении, в случае ранения, выращивания в условиях культуры *in vitro* на искусственных питательных средах, опыления чужеродной пылью, переноса растений в необычные условия существования, выращивания проростков в растворах повышенной (до 6-8%) концентрации сахаров глюкозы или сахарозы и т.п. У растений в таких условиях мутационный процесс резко интенсифицируется в первую очередь, очевидно, вследствие индукции транспозиции мобильных генетических элементов, что вызывает значительные, в некоторых случаях быстрые изменения генома на хромосомном уровне, в частности, структурные перестройки хромосом, а также амплификации геномных последовательностей и другие модификации генома на молекулярном уровне. При этом количество ДНК у растений одного и того же сорта при выращивании в разных условиях может быть различным. У гомеостатических сортов, в отличие от негомеостатических, в неблагоприятных условиях изменения незначительны, либо вовсе не обнаруживаются, как это, например, было установлено при изучении изменчивости рДНК у ячменя. С другой стороны, такие, на первый взгляд, незаметные изменения могут быть результатом перестройки отдельных генов. Например, у салата большие кластеры генов устойчивости дублируются и в дальнейшем подвергаются дивергенции в результате рекомбинации или неравного кроссинговера, что обуславливает появление новых резистентных фенотипов. Эти процессы достаточно распространены в природе и являются важными механизмами не только адапционных, но и

эволюционных процессов (см. /2/, раздел 4, а также /3-5/).

Условия окружающей среды вызывают также весьма существенные изменения генотипа, имеющие направленный характер и способность передаваться по наследству. Растения с такими изменениями называют генотрофами. Например, в течение лишь одного поколения выращивания растений льна в различных контролируемых условиях возникают стабильные линии – генотрофы, которые отличаются друг от друга и от исходной линии не только по морфологическим и биохимическим признакам, но и общим количеством ядерной ДНК, числом генов, кодирующих рибосомные РНК. Для них установлена амплификация повторяющихся последовательностей ДНК; при этом разные семейства последовательностей в разной степени чувствительны к воздействию: в случае выращивания в отличных условиях, амплификация имеет разную степень проявления. Возникновение изменений индуцировалось температурой и/или несбалансированностью минеральных солей в среде.

Следует особо подчеркнуть, что в условиях, приводящих к появлению генотрофов, у растений изменяется баланс фитогормонов, как, например, это было продемонстрировано при выращивании в условиях различного обеспечения элементами минерального питания подорожника, клевера, пшеницы. Подобные результаты были получены также в условиях теплового стресса, в частности у фасоли (см. /2/, с.112-113). (Детальнее о роли фитогормонов в пластичности генома и адаптивности растений см. ниже).

Имеются убедительные свидетельства того, что даже ненаправленные изменения генома, которые возникают в условиях воздействий, выходящих за пределы нормы реакции генотипа, находятся под генетическим контролем. Как отмечала Б. Мак-Клинтон в Нобелевской лекции в 1983 г., геном реагирует на повреждающие (стрессовые) воздействия включением таких геномных механизмов, которые приводят к реконструкции генома клетки. Одним из таких механизмов является активация подвижных генетических элементов. Иными словами, стрессовое воздействие является механизмом, запускающим процессы, вызывающие резкий рост количества мутаций и других геномных

перестроек. Значительная часть изменений, возникающих вследствие этого, имеет адаптивное значение и является основным движущим фактором эволюции. Следовательно, изменчивость соматических клеток, частота возникновения спонтанных мутаций контролируется генотипом и существенно зависит от условий окружающей среды, а индукция геномных перестроек может быть запрограммированной.

Генотипическая обусловленность структурных преобразований хромосом была продемонстрирована Г.А. Левитским еще в 1927 г. Многие данные о генотипическом контроле изменчивости были накоплены позже. В частности, это сведения о регулярных геномных перестройках, происходящих в онтогенезе в норме (например, явление онтогенетической полиплоидии), об отклонении регулярности в случае “генетического дисбаланса” у гибридов, мутантов, инбредных линий и т.п. Установлена зависимость частоты возникновения миксоплоидных форм в потомстве гибридов от генотипа родительских форм; выявлены определенные хромосомы, наличие которых в геноме приводит к хромосомным перестройкам и мозаицизму по числу хромосом; открыты мутации, нарушающие регулярность геномной изменчивости в онтогенезе, функции митотического веретена, вызывающие элиминацию отдельных хромосом. Охарактеризована системная мутация, названная *minute*, определяющая миксоплоидию, выявлена наследственная предрасположенность к некоторым хромосомным аномалиям (в частности, к существованию цикла разрыв – слияние – мост, что приводит к миксоплоидии и другим нарушениям). Б. Мак-Клинтон, которая впервые исследовала этот цикл анафазных мостов, считала его механизмом быстрого изменения структуры генома и рассматривала как фактор инициации стрессового состояния генома, что обуславливает его реорганизацию и стабилизацию, то есть готовность к новому стрессу, который изменяет генные комплексы.

Геномная и хромосомная изменчивость (как в природе, так и в эксперименте) в большинстве случаев сопровождается различными физиологическими изменениями, прежде всего – гормональными изменениями и нарушениями. Гормональные изменения являются причиной

контрастных признаков среди культурных растений, у которых известны формы карликовые и гигантские, поздние и ультрараннеспелые, чувствительные и устойчивые, одно- и многостебельные т.д. В основе проявления таких признаков часто лежат гормональные изменения. В целом у большинства известных мутантов гормональный баланс также изменен, в результате чего они характеризуются повышенной генетической, в том числе хромосомной изменчивостью. Изменения гормонального баланса характерны для отдаленной внутривидовой гибридизации, инцухта, гетерозиса, полиплоидии, анеуплоидии и гаплоидии, цитоплазматической мужской стерильности, в случае применения физических и химических мутагенов, поражения многими вирусами, микроорганизмами, т.е. во всех тех случаях, когда повышается уровень геномной изменчивости (см. /2/, раздел 4.3).

Растения в природе часто подвергаются ранениям. У раневого каллуса, образующегося в результате изменения гормонального баланса, длительное время наблюдаются аномалии клеточного деления, которые обуславливают появление клеток с измененным количеством хромосом. Выращивание каллусных тканей и отдельных клеток в изолированных условиях приводит к более значительным гормональным нарушениям и появлению более заметных геномных изменений (см. /2/, разделы 5-7, а также /6-8/).

Генетический аппарат “получает” информацию об окружающей среде главным образом через аппарат гормональных влияний. В условиях стресса изменяется экспрессия генов растений, в том числе генов, контролирующих синтез и переход в активную форму фитогормонов. Последние являются одним из элементов общих защитно-восстановительных систем организма и выполняют функции модулятора и индуктора изменчивости соматических клеток. При этом регуляторное действие гормонов проявляется в клеточном ядре растений на разных уровнях упаковки хроматина, они модифицируют структуру хроматина, что завершается активизацией (экспрессией) соответствующих генов, в том числе путем изменения метилирования соответствующих локусов хроматина. Следовательно, можно предположить, что гормоны опосредованно

вливают на определенные участки ДНК клеток, находящихся на любой стадии клеточного цикла и любой степени их дифференциации и активизируют необходимые гены.

Накопленные данные позволили нам высказать гипотезу о том, что гормональная система, которая является одним из самых чувствительных рецепторов изменения условий жизнедеятельности клеток и организма в целом, регулируя клеточный и тканевый гомеостаз, контролирует генетическую структуру клеточных популяций организма /2-5/. Молекулярные механизмы гормонального контроля и регуляции уровня и направленности геномной изменчивости соматических клеток растений еще не выяснены. Вероятнее всего, гормональная регуляция этих процессов опосредованная. Экспрессия генов, отвечающих за геномную изменчивость, происходит гормонозависимо. Синтез гормонов и их переход в активную форму находится под контролем генов, регулируемых как внешними, так и внутренними факторами. Недавно полученные данные о том, что активация каскада митогенактивирующих протеинкиназ (MAPKs) регулируется чувствительными к воздействию стресса генами путем трансдукции оксидативных сигналов и этот каскад является молекулярным звеном (линкером) между стрессом и гормоном роста ауксином, подтверждают наши предположения. Однако, для окончательного заключения о механизмах регуляции геномной изменчивости соматических клеток растений полученных результатов недостаточно. Вместе с тем, накопленные данные позволяют во многих случаях не только прогнозировать, но и регулировать уровень геномной изменчивости, используя, в частности, экзогенные фитогормоны и их аналоги. Дальнейшие исследования в этой области, в том числе изучение на молекулярном уровне генетического контроля биосинтеза растительных гормонов и гормонозависимой экспрессии генов, входящих в так называемую мутаторную систему организма, могут дать в руки исследователей мощный инструмент для управления геномной изменчивостью клеток.

Итак, в результате воздействия стресса, создаваемого как внешними, так и внутренними факторами, в растениях повышается уровень геномной изменчивости и нарушается гормональный баланс. Гормональная

система при этом выполняет не только определенную роль в функционировании общих защитно-восстановительных систем организма в процессе адаптации растений, но и влияет (регулирует?) на общий уровень геномной изменчивости, вследствие чего появляются клетки с геномными изменениями, в частности, с различным количеством хромосом, изменяются направление и эффективность клеточного отбора.

Отбор – это суммарный результат ряда процессов, приводящих к полному или частичному устранению группы особей от размножения. В миксоплоидной популяции клеток одного организма в основе отбора могут лежать различия в продолжительности клеточного цикла у клеток разной пloidности. Поскольку клеточный цикл регулируется гормонально, допускается существование специфического, оптимального баланса фитогормонов для клеток разного уровня пloidности, на котором основывается регуляция пloidности клеток в онтогенезе растений. Изменение гормонального баланса приводит к повышению геномной изменчивости, отклонениям в митозе, вследствие чего появляются клетки с измененным числом хромосом, изменяется также направление и эффективность действия клеточного отбора. При этом геномная изменчивость в онтогенезе находится под контролем генетического аппарата и регулируется, скорее всего, путем изменения содержания, соотношения и активности фитогормонов (см. /2/, раздел 4.1.5, а также /3-5/). В условиях различных воздействий, находящихся в пределах нормы реакции генотипа, гормональная система выступает как один из главных защитных (в том числе антимуtagenных) элементов защитно-восстановительных систем организма. При таких воздействиях происходят направленные и, очевидно, запрограммированные геномные перестройки. Вероятно, запрограммированным является также появление некоторых «случайных», «ненаправленных» изменений структуры генома под действием стрессовых воздействий, выходящих за пределы нормы реакции генотипа. При этом повышенный уровень геномной изменчивости является следствием изменения гормонального баланса, вызванного нарушениями генетического и/или физиологического гомеостаза.

Анализ результатов многолетнего изучения динамики генетической структуры клеточных популяций, роли и особенностей действия отбора в процессе адаптации клеток к условиям выращивания *in vitro*, их длительного, в ряде случаев в течение 20-25 и более лет, пассирования в изолированных условиях, детально опубликованных в работах [2, 6-13, 15, 17], позволяет сделать следующие обобщения:

- культура клеток *in vitro* является динамической биологической системой - клонной популяцией, которая развивается (эволюционирует) в результате действия основных движущих факторов эволюции - изменчивости, наследственности, отбора и дрейфа генов (генотипов); взаимодействие этих процессов обуславливает биологические особенности каждой конкретной клеточной линии, которая выращивается в конкретных условиях;
- процесс адаптации клеток к условиям длительного культивирования *in vitro* сложный и многоступенчатый, на разных стадиях формирования культуры *in vitro* (дедифференцировки клеток и их дальнейшей пролиферации, первых пассажей *in vitro*, длительного субкультивирования) наблюдаются различные типы и уровни изменчивости, действуют различные типы естественного отбора - дестабилизирующий, движущий (направленный) или, преимущественно, стабилизирующий;
- индукция процессов дедифференцировки и дальнейшей пролиферации клеток предусматривает перепрограммирование генома, «ювенилизацию» его состояния, переход его из «специализированного» в состояние, характерное для стволовых клеток. Мы считаем, что в процессе развития программы дедифференцировки происходит регрессивная эволюция генома; способность к такой эволюции лежит в основе свойственного многим растениям цикла развития дифференцировка - дедифференцировка - редифференцировка;
- в процессе адаптации клеток к условиям роста *in vitro* можно выделить три периода: первичной популяции изолированных клеток, становления штамма, сформированного штамма. Деление на периоды определяется типом, направлением и жесткостью «естественного» отбора, действующего в клеточной популяции. Для сформированных (адаптированных к росту *in vitro*) штаммов характерно наличие физиологического и генетического гомеостаза, которые обусловлены, в основном, действием стабилизирующего отбора. Это явление может быть моделью глубокой (но обратимой) регрессивной эволюции биологической системы – от многоклеточного к одноклеточному уровню;
- сформированные штаммы являются генетически гетерогенными клеточными популяциями; размах изменчивости в них для некоторых видов растений (их отдельных генотипов?) по некоторым признакам может в отдельных случаях превышать межвидовую изменчивость в природе;
- значительная часть реорганизаций генома культивируемых клеток является канализированной; изменчивость, которая наблюдается в культуре *in vitro*, часто является подобной естественной изменчивости растений родственных видов; доминирование в генетически гетерогенных популяциях именно канализированных изменений может свидетельствовать об их адаптивности;
- генетический полиморфизм культивируемых клеток, полученных от одного растения (генотипа), может отражать весь, или, по крайней мере, значительную часть как внутри-, так и межпопуляционного полиморфизма, свойственного данному виду растений;
- сходство геномных изменений, наблюдаемых в процессе адаптации клеток к условиям роста *in vitro* и геномной изменчивости в природе, в том числе в процессе видообразования, свидетельствует о возможности применения закона гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Вавилова к культуре клеток; это позволяет прогнозировать особенности геномной изменчивости *in vitro*;
- сходство геномной, в частности хромо-

сомной, эволюции клеточных культур и изменений, которые лежат в основе видообразования, имеет безусловно важное значение для понимания некоторых закономерностей эволюционного процесса и дает возможность моделировать его на клеточном уровне;

- значительная часть геномных изменений, возникающих и выявляемых в культивируемых клетках, не обнаруживается в растениях-регенерантах; клетки с глубоко реорганизованным геномом не могут регенерировать жизнеспособное растение; это уменьшает реальность надежд на получение соматоклональных вариантов со свойствами, ранее неизвестными селекционерам; прежде всего это касается видов растений с простыми (не полиплоидными) геномами;
- выявление основных факторов и движущих сил геномной изменчивости клеточных популяций *in vitro*, установление ведущей роли в этом процессе гормональной системы позволяет в определенной мере регулировать не только генетическую структуру клеточных популяций, но и функционирование их генома, в частности биосинтез вторичных метаболитов; благодаря чему созданы высокопроизводительные клеточные штаммы и линии редких и особо ценных лекарственных растений - альтернативный источник экологически чистого лекарственного сырья.

На основе изложенных выше в обобщенном виде данных, опубликованных в виде серии статей и монографий (см., например /2-17/), возможно высказать следующие три главных предположения:

1) Любая соматическая клетка с живым (функционально активным) ядром при ее изолировании и дальнейшем выращивании в условиях культуры тканей вследствие процессов «соматоклональной» изменчивости, происходящих в рамках закона гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Вавилова, может восстановить в своих потомках, в том числе среди растений-регенерантов, весь генетический полиморфизм (или, по крайней мере, значительную его часть) свойственный данному виду, а возможно, даже и роду растений. Это открывает возможность сохранения и возобновления природного полиморфизма в культуре клеток и тканей *in vitro*.

2) Растение – это система клеточных популяций, которая характеризуется пластичностью своего генофонда, что при взаимодействии с клеточным отбором обеспечивает адаптивность растения как целостного организма и создает возможность наследования (передачи потомкам) адаптивных геномных изменений, приобретенных в течение онтогенеза. Большинство таких изменений следует отнести к эпигеномной изменчивости, поскольку они, очевидно, не затрагивают генетического кода и, в принципе, являются обратимыми.

3) Ключевую роль в обеспечении пластичности генома (регуляции его изменчивости в соматических клетках), в определении типа, направленности и жесткости «естественного» отбора, действующего в клеточной популяции, а также в интеграции клеточных популяций в целостный организм играет гормональная система растения.

Экспериментальные данные, подтверждающие высказанные положения и предположения, изложены нами в соответствующих публикациях /2-17/.

Список использованной литературы

1. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В., Белявская Н.Л., Климчук Д.А., Недуха Е.М. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. – Киев: Наукова думка, 2003. – 278 с.
2. Кунах, В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ: Логос, – 2005. – 730 с.
3. Кунах, В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений и факторы, регулирующие этот процесс. // Цитология и генетика – 1980. – Т. 14, № 1. – С. 73–81.
4. Кунах, В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе. // Биополимеры и клетка (Biopolym. Cell) – 1994. – Т. 10, № 6. – С. 5–35.
5. Кунах, В.А. Геномная изменчивость

- соматических кліток рослин. 2. Изменчивость в природе. // Биополимеры и клетка (Biopolym. Cell) – 1995. – Т. 11, № 6. – С. 5–40.
6. Кунах, В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro*. // Биополимеры и клетка (Biopolym. Cell) – 1997. – Т. 13, № 5. – С. 362–367.
7. Кунах, В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro*. // Физиология растений – 1999. – Т. 46, № 6. – С. 919–930.
8. Кунах, В.А. Еволюція геному рослин в культурі клітин *in vitro*: особливості, причини, механізми та наслідки. // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. Т. 1, Київ, Логос, 2001, С. 53–67.
9. Кунах, В.А. Механізми та деякі закономірності соматическої мінливості рослин. // Вісник Українського тов-ва генетиків і селекціонерів – 2003. – № 1. – С. 101–106.
10. Андреев І.О., Спирідонова К.В., Кунах В.А. Перебудови рослинного геному в культурі клітин *in vitro*. // Біополімери і клітина (Biopolym. Cell) – 2004. – Т. 20, № 1–2. – С. 42–49.
11. Андреев І.О., Спирідонова Е.В., Соловьян В.Т., Кунах В.А. 18S–25S рДНК некоторых видов рода *Rauwolfia*: межвидовой полиморфизм и перестройки в культуре *in vitro*. // Вісник Українського тов-ва генетиків і селекціонерів – 2004. – Т. 2, № 2. – С. 63–170.
12. Andreev I.O., Spiridonova K.V., Solovyan V.T., Kunakh V.A. Variability of ribosomal RNA genes in *Rauwolfia* species: parallelism between tissue culture-induced rearrangements and interspecies polymorphism. // Cell Biology International – 2005. – V. 29. – P. 21–27.
13. Кунах В.А., Андреев І.О., Спирідонова К.В. Міжвидовий поліморфізм і мінливість генів 18S–25S та 5S рРНК в культурі тканин *Rauwolfia Benth.* і *Gentiana L.* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – Т. 38, № 2. – С. 110–123.
14. Parnicoza I.Yu., Miryuta N.Yu., Maidanyuk D.N., Loparev S.A. et al. Habitat and leaf cytogenetic characteristics of *Deschampsia antarctica* Desv. in Maritime Antarctica // Polar Science – 2007. – V. 1. – P. 121–128.
15. Майданюк Д.М., Андреев І.О., Спирідонова К.В., Кунах В.А. Генетичний поліморфізм соматических ліній кукурудзи, отриманих від лінії P346 // Біополімери і клітина (Biopolym. Cell) – 2007. – Т. 23, № 4. – С. 324–331.
16. Кунах В.А., Адонін В.І., Ожередов С.П., Блюм Я.Б. Міксоплоїдія у диких та культивованих видів хрестоцвітих, здатних до гібридизації з ріпаком *Brassica napus*. // Цитология и генетика – 2008. – Т. 42, № 3. – С. 81–86.
17. Андреев І.О., Спирідонова Е.В., Майданюк Д.Н., Кунах В.А. Генетические эффекты культивирования *in vitro* тканей кукурузы. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 487–495.

Дата поступления статьи 22 ноября 2010 г.

РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОТИПОВ СОВРЕМЕННЫХ СОРТОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПО ПОТРЕБНОСТИ В ЯРОВИЗАЦИИ И ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Селекционно-генетический институт

Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук
Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дорога, 3

Введение

Теория стадийного развития зерновых колосовых культур общепризнанна в мире и для генетиков пшеницы она нашла свое отражение в идентификации генетических систем, которые контролируют разнообразие генофонда по продолжительности яровизационной потребности и отзывчивости скоростью колошения на изменение продолжительности фотопериода. Темпы развития до начала закладки зачатков репродуктивных органов и колошения у большинства зерновых колосовых культур, в т.ч. и у мягкой пшеницы, в значительной мере определяются длительностью и скоростью прохождения стадий яровизации и световой. Для озимых пшениц, с одной стороны, они оказывают существенное влияние на особенности формирования вегетативной массы и накопления продуктов биосинтеза в осенний период, что, безусловно, сказывается на способности противостоять стрессовым факторам при перезимовке. С другой стороны, это влияние распространяется в значительной мере и на скорость последующего перехода к колошению, позволяющей избегать воздействия стрессовых факторов в период налива зерна и созревания.

Возможности физиологического манипулирования указанными особенностями зависят от разнообразия генофонда по длительности и скорости прохождения яровизации и световой стадии в температурных и световых условиях конкретного региона. А генетический контроль данного разнообразия согласно общеизвестных сведений определяется генами и аллелями нескольких генетических систем: система минимум трех генов *Vrn* – наличие или отсутствие потребности в яровизации пониженными температурами, т.е., озимости

или яровости, для озимых пшениц характерен полностью рецессивный по всем трем *vrn* локусам генотип. Система минимум трех *Vrd* генов – в пределах рецессивного *vrn* генотипа разнообразие аллелей *Vrd* генов определяет продолжительность или скорость прохождения стадии яровизации при определенных температурно-световых условиях. Система минимум трех *Ppd* генов – после удовлетворения потребности в яровизации в рамках перечисленного разнообразия различия *Ppd* генов контролируют длительность и темпы прохождения световой стадии при конкретном температурно-световом режиме, после которой начинается закладка и формирование цветочных бугорков и примордиев, обеспечивая дальнейшее развитие и переход к колошению под контролем разнообразия генов системы *Eps* (скороспелости *per se*), не зависящей от яровизационных и фотопериодических воздействий и реакций (различия по отзывчивости на варьирование ростовых температур, интенсивность освещения и т.д.) [1].

Следует отметить, с одной стороны, что, как правило, доминантность аллелей генов любой из этих систем ускоряет развитие (сокращает длительность соответствующей стадии), а рецессивность – замедляет его (удлиняет стадию) для адаптации к условиям конкретного региона. А с другой стороны, хотя эти системы генетически независимы и их экспрессия и выявление основного прямого эффекта разобщены по времени в указанной последовательности, все же между ними наблюдается некоторое физиологическое взаимодействие: эффект сокращения или удлинения стадии по одной из систем частично ускоряет или за-

медляет прохождение иных стадий. Очевидно, это связано с биохимическим родством (или сходством) гормональных продуктов (или их эффектов), влияющих на темпы развития и контролируемых разными системами генов.

Учитывая особую важность различий по скорости развития в их влиянии на устойчивость к повреждениям стрессовыми абиотическими и биотическими факторами (или на способность

избегать их) [2], а также эффекты этих систем через различия в накоплении биомассы влиять на конечную продуктивность, мы и проводим, во-первых, идентификацию их генотипов по локусам *Vrd* и *Ppd* систем, и во-вторых, оценку современных сортов и селекционных линий по продолжительности потребности в яровизации, а также по степени чувствительности их к изменению фотопериода.

Материалы и методы

Анализ образцов озимой мягкой пшеницы по продолжительности яровизации и фоточувствительности осуществляется путем сопоставления дат колошения после темпоральной яровизации в климатических камерах (60-30 суток) в бумажных рулонах зеленых 5-дневных проростков, которые затем одновременно пересаживаются в сосуды с почвой в конце апреля (отсутствие яровизирующих температур) для выращивания на естественном (15-17 часов) и искусственно сокращенном (до 10 часов, накрывание темными кабинами) фотопериодах [3].

В качестве контролей при оценке физиологических реакций различных образцов на начальных стадиях их развития используется ежегодно один и тот же набор идентифицированных по *Vrd* и *Ppd* линий (почти изогенные и замещенные). Следует указать, что в разные сезоны абсолютные показатели степени фоточувствительности и разниц дат колошения между вариантами длительности яровизации могут существенно различаться для одних и тех же образцов, что скорее всего связано с неодинаковостью погодных условий по сезонам (температурный режим в период

вегетации, интенсивность инсоляции и т.д.) даже при близких датах высадки материала, поэтому использование одних и тех же контролей в подобных экспериментах является обязательным. Это позволяет сравнить оценки в неодинаковых наборах образцов, изучаемых в разные сезоны, по их ранжированию относительно контролей, поскольку ранжирование контролей (и оцененных в нескольких сезонах одних и тех же образцов) очень близко совпадает при сравнении их между сезонами: коэффициент ранговой корреляции достигает $0,87 \pm 0,048$.

Для идентификации генотипов современных сортов по *Vrd* и *Ppd* системам генов используется гибридизация с тестерами этих генов (как правило почти изогенные линии: полностью рецессивная и моногенно доминантные по каждому из локусов линии) и анализ расщепления растений F_2 по скорости колошения после длительности яровизации, свойственной более «раннему» родителю, и выращивании на естественном фотопериоде (расщепление по *Vrd* генам), или же после «максимальной яровизации» и выращивании на сокращенном фотопериоде (расщепление по *Ppd* генам) [4, 5].

Результаты и обсуждение

При оценке набора контрольных линий по различиям в продолжительности потребности в яровизации они выявляли размах от 30-35 суток до 55-60 суток и все экспериментальные образцы не выходили за эти пределы. Размах контрольных образцов по степени фоточувствительности наблюдался от 4-25 до 7-30 суток в разные сезоны, граница между чувствительностью носителей доминантных и рецессивных аллелей по сезонам могла коле-

баться от 9 до 14 суток, соответственно. На основании подобных оценок осуществляется ранжирование испытуемых образцов, реакции которых попытаемся сопоставить за периоды оценок 2002-2005 годов и 2006-2009 годов.

В первый период из 139 оцененных образцов преобладающее количество выявило по сравнению с контрольным набором слабую и средне-слабую фотореакции и лишь $12,2 \pm 2,77\%$ их проявляли от среднего до силь-

ного уровня фоточувствительности, причем 6 из них относились к образцам контрольного набора или инорайонным представителям коллекции. Аналогично, абсолютное большинство сортов и/или селекционных линий института не выявляли потребность в яровизации дольше 45 суток и только 11,5±2,71% выколашивались в нормальные сроки после 50 и более суток яровизации, 4 из них относились к контрольным образцам. Испытанный же за 4 последних года набор новых сортов и линий показал достоверные тенденции селекционного сдвига в сторону улучшения адаптивных реакций. Так, за этот период из 144 оцененных сортов и линий поздних поколений 24,3±3,57% образца проявляли среднюю и выше фотореакцию и 27,8±3,68% их требовали для нормального колошения 50 и более суток яровизации. Очевидно, что за 8 лет возобновления работ по оценкам указанных физиологических параметров наблюдается увеличение в 2,0-2,5 раза доли образцов, более задерживающих развитие в осенний период, и это может способствовать усилению их зимостойкости [6].

Идентификация *Ppd* генотипов современных среднерослых и полукарликовых сортов озимой пшеницы СГИ выявила наличие шести различных *Ppd* генотипов. С очень высокой частотой (78,4%) встречаются доминантные только по аллелю *Ppd-D1a* генотипы. Частоты других пяти *Ppd* – генотипов очень малы (от 0 до 7%). Их суммарная доля в наборе сортов СГИ всего около 20%. Частота доминантного аллеля *Ppd-D1a* составляла 85,7±6,8%, а частоты аллелей *Ppd-A1a* и *Ppd-B1a* – 8,9±3,8 и 5,4±3,0%, соответственно. Столь высокая частота аллеля *Ppd-D1a* обусловлена присутствием в генотипах всех сортов-доноров генов короткостебельности, используемых в СГИ, аллеля *Ppd-D1a*.

Заключение

Полученные результаты позволили рекомендовать селекционерам использование идентифицированных доноров доминантных аллелей *Vrd2* (Знахидка одесская, Одесская 132, Прибой и др.) и *Ppd-B1a* (Донская полуинтенсивная, Ольвия, Сибирская нива, Селянка и др.) при создании новых короткостебельных морозостойких и высокоурожайных сортов озимой мягкой пшеницы для условий юга степи Укра-

Гибридологический анализ 55 сортов озимой пшеницы (из них 43 сорта СГИ) позволил выявить пять групп различных *Vrd* генотипов. Двадцать восемь сортов или 50,9±6,74% имели генотип *Vrd1 vrd2*. Частоты генотипов *vrd1 vrd2* (10,9±4,20%), *vrd1 Vrd2* (16,4±4,99%) и *Vrd1 Vrd2* (18,2±5,20%) оказались значительно ниже и существенно не различались между собой. С частотой 3,6±2,51% выявлены генотипы, возможные источники третьего, неаллельного генам *Vrd1* или *Vrd2*, гена *Vrd3*.

В то же время, в зависимости от условий года изучения разные гены *Ppd-1* и *Vrd* неодинаково влияют на устойчивость к абиотическим факторам и урожай зерна. Урожай зерна разных *Ppd* и *Vrd* генотипов в годы с суровыми условиями зимовки определяется уровнем зимостойкости конкретного генотипа. Меньший эффект по снижению зимостойкости и морозостойкости растений, особенно в конце зимы, оказывает аллель *Ppd-A1a*, несколько больший – *Ppd-B1a* и значительный – *Ppd-D1a*. По степени снижения зимо- и морозостойкости различные *Vrd* генотипы можно расположить в следующем порядке: $vrd1 vrd2 \leq vrd1 Vrd2 < Vrd1 vrd2 = Vrd1 Vrd2$. Эффект доминантного аллеля *Vrd1* по снижению морозостойкости значительно выше, особенно в середине января и начале марта, независимо от наличия доминантного или рецессивного аллеля гена *Vrd2* [7].

Урожай зерна и его составляющих в годы с мягкими зимами не зависят от различий по генам *Vrd*. А доминантные аллели генов *Ppd* в такие годы значительно увеличивают урожай, главным образом за счет формирования более тяжеловесного колоса, по сравнению с альтернативными аллелями генов. Значительный эффект по урожаю зерна характерен для *Ppd-B1a* и *Ppd-D1a* генотипов [8].

ины, поскольку генотипы *vrd1 Vrd2* и *Ppd-A1b Ppd-B1a Ppd-D1b* более зимо-, морозостойкие и достоверно не отличаются по урожаю зерна от наиболее распространенных в настоящее время в производстве *Vrd1 vrd2* и *Ppd-A1b Ppd-B1b Ppd-D1a* генотипов, соответственно. Рекомендованный генотип уже идентифицируется среди созданных в последние годы линий озимой мягкой пшеницы.

Список использованных источников

1. Файт, В.И. Выявление различий по реакции на интенсивность освещения у яровых сортов мягкой пшеницы / В.И. Файт, А.Ф. Стельмах // Цитология и генетика. – 1997. – Т. 31, № 5. – С. 22–27.
2. Mahfoozi, S. Influence of vernalization and photoperiod responses on cold hardiness in winter cereals / S. Mahfoozy, A.E. Limin, D.B. Fowler // Crop Sci. – 2001. – № 41. – P. 1006–1011.
3. Стельмах, А.Ф. Яровизаційна потреба та фоточутливість сучасних генотипів озимої м'якої пшениці / А.Ф.Стельмах, М.А.Литвиненко, В.І.Файт // Зб. наук. праць / СГІ – НАЦ НАІС. – Одеса, 2004. – Вип. 5 (45). – С. 118–127.
4. Файт, В.І. Ідентифікація сортів озимої м'якої пшениці за генами фотоперіодичної чутливості / В.І. Файт, В.Р. Федорова // Зб. наук. праць / СГІ – НАЦ НАІС. – Одеса, 2007. – Вип. 9 (49). – С. 9–21.
5. Файт, В.И. Генетический контроль продолжительности яровизации сортов озимой пшеницы юга степи Украины / В.И. Файт // Экологическая генетика. – 2006. – Т. IV, Вып. 2. – С. 29–36.
6. Стельмах, А.Ф. Новий “оберт спіралі” в селекції озимих пшениць України на адаптивність / А.Ф. Стельмах, В.І. Файт // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2009. – Т. 6. – С. 87–92.
7. Мокану, Н.В. Различия эффектов аллелей генов *Vrd1* и *Ppd-D1* по зимостойкости и урожаю у озимой пшеницы / Н.В. Мокану, В.И. Файт // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, № 6. – С. 28–35.
8. Файт, В.І. Ідентифікація і ефекти алелів генів темпів розвитку пшениці: автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.15 / В.І. Файт; Сел.-ген. ін-т – Нац. центр насіннєзн-ва і сортівчєння. – Одеса, 2009. – 39 с.

Дата поступления статьи 10 января 2011 г.

РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ПАСПОРТИЗАЦИИ ПОРОД И ПОПУЛЯЦИЙ ДОМЕСТИЦИРОВАННЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
Российская Федерация, 119991, г. Москва, ул. Губкина, д. 3

Введение

Перед человечеством в XXI веке стоят две глобальные проблемы: это, во-первых, обеспечение постоянно растущего населения Земли продуктами питания, и продовольственная безопасность каждой отдельной страны, а, во-вторых, сохранение биоразнообразия нашей планеты, что необходимо для поддержания устойчивого состояния биосферы. Тесно связана с ними проблема сохранения генетического разнообразия видов одомашненных животных и культурных растений. Общеизвестно, что наилучшим способом сохранения разнообразия видов сельскохозяйственных животных является сохранение разнообразия пород внутри одомашненного вида. Насколько необходимо сохранение породного разнообразия? Например, в некоторых странах Европы и Ближнего Востока (Чехии, Израиле и т.п.) обходятся разведением 2-3-х лучших пород мировой селекции в каждом виде сельскохозяйственных животных. Однако такая сельскохозяйственная политика чревата неприятными, если не сказать, катастрофическими последствиями, в особенности, для Российской Федерации. В отличие от небольших Европейских стран, Российская Федерация занимает обширные территории, на которых сосредоточено множество агроэкологических зон. Для этих зон необходимы различные животные, адаптированные к местным условиям, способные приносить в этих условиях качественную, а порой и уникальную продукцию (например, сыры из молока ярославских коров или яка, пух оренбургских и алтайских коз и т.п.). Породы – для европейской части страны и Сибири, севера и юга, гор и лесов, для территорий, изобилующих естественными пастбищами и для окрестностей мегаполисов, где дорога каждая сотка земли. Породы – для традиционного или

интенсивного животноводства. Породы – для определенного жизненного уклада. Иными словами, Российской Федерации необходимы и узкоспециализированные, и многофункциональные породы.

Когда мы говорим о домашних (сельскохозяйственных) животных, речь идет не только об уникальных генофондах, национальных агроресурсах, продовольственной безопасности, но и о социальной защищенности, сохранении народных традиций, знаний, которые достались нам от предков. В процессах увеличения или уменьшения численности животных, мы очень часто игнорируем качественный состав, собственно генофонд, носителями которого являются породы.

Теряя собственные агроресурсы, веками сформировавшееся породное разнообразие, мы неминуемо сталкиваемся со следующими негативными фактами:

- селекционными, социальными, экологическими проблемами;
- острой нехваткой собственного (не импортного) животноводческого сырья;
- потерей традиционного животноводства и уникальных исторически сложившихся агроэкосистем;
- исчезновением основ производства продуктов органического происхождения.

В РФ была сделана ставка на импорт генетического материала и его хаотичное распространение по стране. Считается, что российские породы по ряду объективных и субъективных причин не могут конкурировать с более продуктивными зарубежными породами. В настоящее время доля российских местных и региональных пород разводимых в РФ, составляет – 49%, международных – 51%. За последние десятилетия доля российского генофонда неуклонно снижается. После образо-

вания на территории СССР новых государств, проведения экономических реформ, приведших к глобальному сокращению численности животных, а также в результате политики в области селекции и разведения последних десятилетий российское животноводство потеряло, в зависимости от отрасли, от 20 до 50 процентов пород (например, такие потери мы наблюдаем среди пород крупного рогатого скота и овец). Исчезли с лица земли юринский, бурятский, сибирский крупный рогатый скот, битюгская, миховская, бокинская, черкасская овцы, орловско-ростопчинская, тавдинская, черноморская, минусинская лошади, длинноухая белая, каликинская породы свиней – и этот список можно продолжить. Из оставшихся две трети находятся под угрозой исчезновения или находятся по численности в критическом состоянии [1]. (Международная продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН ФАО (FAO) определяет породу, «находящуюся под угрозой исчезновения», как породу, численность которой составляет менее одной тысячи самок и менее 20 самцов. Породы, где разводят менее 100 самок и менее 5 самцов, относятся к «критическому статусу», иными словами такие породы находятся на грани исчезновения.)

Сельскохозяйственная политика в РФ за последние два-три года заметно изменилась. В принятых положениях Международной конвенции о биологическом разнообразии и Национальной Стратегии сохранения биоразнообразия России в качестве одной из первоочередных задач, формулируемых этими документами, рассматривается «сохранение, устойчивое использование и инвентаризация генетических ресурсов живых организмов». Приоритетными объектами охраны в агробиоценозах должны стать локальные породы одомашненных животных и сорта культивируемых растений. В последнее время в регионах нашей страны начали создаваться генофондные хозяйства, призванные восстанавливать и разводить в чистоте локальные (региональные) породы. В настоящее время на территории Российской Федерации разводится более 400 пород (официально в МСХ РФ на 01.01.2007 зарегистрировано 394), относящихся к 46 видам сельскохозяйственных животных – млекопитающих, птиц, рыб и насекомых. Из

них 198 пород среди 33-х domestцированных видов относятся к локальным породам [1].

Для разведения и поддержания «в чистоте» этих пород необходимы знания о структуре их генофондов, недорогие и эффективные методы для оценки генетического разнообразия пород, их дифференциации. Наиболее информативными для этой цели во всем мире считаются биотехнологические методы, основанные на анализе полиморфизма ДНК. Среди них приоритетным, на сегодняшний день, является метод микросателлитного анализа ДНК.

Микросателлиты относятся к диспергированным tandemно повторяющимся ди-, три- и тетра-нуклеотидным последовательностям. Общий размер повторяющейся области составляет, как правило, не более 100 п.н. Эти маркеры известны под несколькими названиями: микросателлиты, STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site), STR (short tandem repeat), SSR (simple sequence repeat) [2-3]. Для создания маркеров на основе STR подбираются праймеры к уникальным последовательностям ДНК, фланкирующим микросателлитный повтор, что требует предварительного знания их нуклеотидной последовательности. Полиморфизм STR определяется различной копийностью мономерных единиц в кластере, что приводит к существованию множественных аллельных вариантов. Гетерозиготность их очень высока (часто более 75%). Гипервариабельные микросателлиты представляют собой универсальную систему генетических маркеров для анализа наследуемых изменений на уровне ядерной ДНК и широко используются в исследованиях генетического полиморфизма популяций человека, растений и животных. Микросателлитные маркеры Y-хромосомы позволяют изучать «отцовскую линию» и используются в филогенетических исследованиях. Используя метод микросателлитного анализа, можно определить с 95%-ной вероятностью к какой породе относится лошадь. Такая высокая степень точности оценки дает возможность отнести изучаемый объект к определенной породе с вероятностью близкой к единице. Контроль родословных лошадей, крупного рогатого скота, свиней и собак по панелям локусов микросателлитных ДНК, стандартизованными сравнительными тестами при содействии Международного Обще-

ства Генетики Животных (the International Society for Animal Genetics, ISAG), вошел в общепринятую практику во многих странах. Однако для других видов сельскохозяйственных животных такие стандартизованные панели микросателлитов пока не разработаны.

Несмотря на высокую популярность, микросателлиты имеют и некоторые недостатки. Неравномерность скорости мутирования разных микросателлитов создает определенные сложности для популяционно-генетического анализа. Существуют и технические проблемы, такие как артефакты при проведении ПЦР (за счет эффекта «проскальзывания»). Кроме того, возможность использования микросателлитов для исследования аборигенных пород не достаточно изучена. Число аллелей каждого локуса микросателлитов может довольно сильно отличаться у пород лошадей разного происхождения. Это зачастую обуславливает необходимость индивидуального подхода к выбору локусов микросателлитов для анализа. Однако основным ограничением, особенно для нашей страны, является высокая стоимость оборудования и наборов реагентов, что делает затруднительным использование этого метода для масштабных исследований.

Можно использовать для оценки меж- и внутривидового генетического разнообразия анализ однонуклеотидного полиморфизма (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) индивидуальных локусов. В этом случае необходимо исследовать 17-20 локусов и более, что делает этот метод в настоящее время громоздким, длительным и дорогостоящим. В будущем данный подход имеет большие перспективы в связи с развитием нанотехнологий и создания на их основе микрочипов для быстрого тестирования большого числа локусов. Необходима разработка других подходов, которые бы имели достаточно высокий уровень разрешающей способности и информативности при невысокой стоимости и скорости анализа.

В качестве таких маркеров наибольший интерес представляет класс ДНК-маркеров, имеющих множественную локализацию в геноме и позволяющих тестировать одновременно от 20 до 35-40 локусов. Это может быть достигнуто при использовании одного короткого праймера с произвольной последовательностью (RAPD - Randomly amplified polymorphic DNA и ее аналогов) [4-5], праймеров с искус-

ственно добавленными последовательностями (адаптерами) (AFLP - Amplified fragment length polymorphism) [6] или праймеров, комплементарных к повторяющимся элементам генома, таким как микросателлиты (ISSR – Inter-simple-sequence-repeats) [7].

Среди перечисленных типов маркеров наиболее привлекателен метод ISSR-анализа. Этот метод лучше воспроизводится, чем RAPD-анализ, благодаря более длинным праймерам, но по простоте анализа не уступает RAPD, в отличие от метода AFLP, предусматривающего проведение дополнительных процедур (рестрикция ДНК и лигирование с адаптерами).

Для создания ISSR-маркеров используют праймеры, комплементарные микросателлитным повторам (4-12 единицам повтора) и несущие на 3'-конце последовательность из 1-3-х произвольных нуклеотидов (так называемый «якорь») [7]. Метод ISSR-фингерпринтинга широко используется в генетике растений, но редко применялся для изучения популяций животных, хотя была показана его информативность в исследовании генетического разнообразия животных [8-10]. В значительной мере возможности его применения ограничивались сложностью статистической обработки, поскольку не было пакетов программ, специализированных для анализа доминантных маркеров. Однако к началу 2007 года появилась новая версия компьютерной программы STRUCTURE V 2.2, позволяющая работать как с кодоминантными маркерами (микросателлиты, SNP, RFLP и др.), так и с маркерами доминантного типа (RAPD и ISSR) [11]. Метод оказался высокоинформативным и универсальным. Он может быть использован для анализа генофондов пород различных видов домашних животных: крупного рогатого скота, овец, лошадей, яков, верблюдов, свиней, кур, кошек и других domesticированных видов [12-14].

Целью нашего исследования стала разработка универсального метода на основе метода ISSR-фингерпринтинга в сочетании с обработкой данных с использованием программы STRUCTURE V 2.2, определение возможностей разрабатываемого подхода для анализа популяционной структуры domesticированных видов, генеалогии, сходства генофондов, оценки чистоты пород и внутривидовых групп сельскохозяйственных животных.

Материалы и методы

Основные исследования выполнены на 18 популяциях тувинской короткожирнохвостой овцы (N=1100), 19 породах крупного рогатого скота (N=766), а также на романовской породе овец (N=53), советской шерстной породе коз (N=60), тувинских яках (N=60) и тувинских верблюдах (N=27). Всего было изучено: 5 domesticiрованных видов, 9 пород и 26 популяций.

Метод ISSR-PCR применяли с использованием праймеров (AG)_nC и (GA)_nC к микросателлитным локусам (TC)_n и (CT)_n как участков отжига праймеров. Амплификацию проводили в следующем режиме: начальная денатурация – 2 мин при 94-95°C, денатурация 30 сек при 94°C, отжиг 30 сек при 55°C, синтез 2 мин при 72°C. Финальный синтез 7-10 минут при 72°C. Количество циклов амплификации – 35-37. Фракционирование продуктов амплификации

проводили в 2%-ом агарозном геле с использованием в качестве маркера молекулярных масс GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas) с напряжением 120 В в течение 100-110 мин. После электрофореза гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в коротковолновом УФ-свете. Размер и количество фрагментов в полученных ISSR-фрагментах определяли с использованием программы «Onedscan». С помощью программы «Excel» были созданы бинарные матрицы, в которых наличие и отсутствие каждого фрагмента в паттерне животных каждой породы отмечены цифрами 1 и 0 соответственно.

Для более точного определения молекулярного веса выявленных фрагментов ДНК нами разработана универсальная шкала, где применена определенная градация молекулярного веса (табл. 1).

Таблица 1

Универсальная шкала размерности ISSR-фрагментов в п. н.

Мажорные фрагменты	Наиболее часто встречающиеся фрагменты	Минорные фрагменты
2100-2000	1230-1180	290-280
1900-1800	1170-1120	270-260
1750-1700	1110-1060	250-240
1650-1600	1050-1000	230-220
1550-1500	990-940	210-200
1450-1400	930-880	180-160
1350-1300	870-820	
1290-1240	810-760	
	750-720	
	710-680	
	670-640	
	630-600	
	590-560	
	550-530	
	520-500	
	490-470	
	460-440	
	430-410	
	400-380	
	370-360	
	350-340	
	330-320	
	310-300	

В зависимости от зоны (минорной, средней, мажорной) использовался определенный шаг от 10 до 100 пар нуклеотидов (п.н.). Таким образом, учитывали 37 зон с фиксированным интервалом, которые позволяют достаточно точно определять молекулярный вес для 37 ПЦР-продуктов. Использование единой универсальной шкалы позволяет выявить закономерности в распределения фрагментов и провести сравнительное ис-

следование породных, а в дальнейшем и межвидовых отличий.

Результаты ISSR анализа обрабатывали с помощью программы STRUCTURE V 2.2. [11, 15]. Статистическую обработку данных осуществляли также с помощью стандартных компьютерных программ «Statistica 8.0», «Popgene 1.32». Генетическое расстояние между внутривидовыми группами определяли по Нею [16].

Результаты и обсуждение

ISSR-маркеры относятся к маркерам доминантного типа наследования, полиморфизм которых тестируется по наличию/отсутствию полосы. Среди продуктов амплификации, полученных при использовании праймера (AG)_nC у пяти domesticированных видов животных, наиболее надежно выявлялись 38 фрагментов, каждый из которых в дальнейшем рассматривался как отдельный локус. Для создания матриц и сравнительного анализа по межмикросателлитным локусам была использована единая универсальная шкала, включающая 38 ПЦР-продуктов, для определения параметров молекулярной массы фрагментов ДНК различных видов животных.

Использованная нами программа Structure v2.2 основана на анализе несцепленных между собой генетических маркеров, при этом изначально предполагается, что исследуемая популяция находится в равновесии то есть соответствует закону Харди-Вайнберга. К тому же предложенный алгоритм не учитывает влияние мутационного процесса на популяцион-

ную структуру [15, 17]. Вычислительные возможности программы Structure v2.2 позволяют выявить наличие субпопуляций в исследуемой популяции и наглядно продемонстрировать отношение конкретных особей ко всей выборке, выявлять гибридные (помесные) и чужеродные особи, а также определять сходство популяций и исследовать их родословные, в частности вычислять вероятность встречи предков в прапопуляциях [15].

Это позволило использовать метод ISSR-фингерпринтинга в сочетании с обработкой данных с помощью программы STRUCTURE 2.2 для анализа сходства генофондов, оценки консолидированности и чистоты пород сельскохозяйственных животных. Метод оказался высокоинформативным и универсальным. Он может быть использован для анализа генофондов пород различных видов сельскохозяйственных животных: крупного рогатого скота (КРС), овец, лошадей, яков, верблюдов, свиней.

На рис. 1 приведен пример анализа трех пород турано-монгольского корня.

Величина сходства особей с генофондом популяции



Рис. 1. Анализ сходства генофондов калмыцкой (1), якутской (2) и монгольской (3) пород крупного рогатого скота на основе популяционно-статистической обработки данных ISSR-фингерпринтинга с использованием программы Structure v2.2. Каждый столбик соответствует одной особи.

Прослеживается четкая дифференциация пород. Большинство животных имеет незначительные примеси чужеродных генофондов, однако, три особи достоверно отличаются от генофонда основной популяции: одна – в якутской популяции и две – в монгольской. В монгольской популяции одна из особей явно по своему генотипу относится к калмыцкому скоту. Сложно обсуждать

причину появления данной особи среди хорошо консолидированной популяции, но, вне всякого сомнения, что данные ISSR-фингерпринтинга могут быть весьма полезны для выбраковки нежелательных животных и поддержания чистопородности стад в генофондных хозяйствах.

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

Величина сходства особей с генофондом популяции

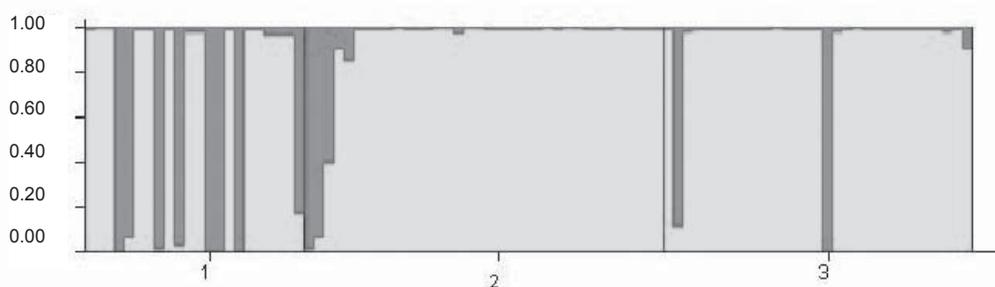


Рис. 2. Анализ консолидированности и чистопородности стад калмыцкого скота из трех хозяйств на основе популяционно-статистической обработки данных по ISSR-фингерпринтингу с использованием программы Structure v 2.2. Каждый столбик соответствует одной особи.

Из рис. 2 четко видно, что выборка животных из хозяйства 1 неоднородна, а в хозяйствах 2 и 3 стада достаточно хорошо консолидированы, однородны и выбраковке подлежат 2-3 животных из каждого хозяйства. Ценность метода заключается также и в том, что он позволяет выявить конкретных животных, несущих примеси чужеродных генофондов, что значительно облегчает работу селекционера по поддержанию чистоты и консолидированности стада, его породного соответствия.

Аналогичные картины были получены для романовской и тувинской короткожирнохвостой овцы, советской шерстной породе коз, тувинского яка и популяции верблюдов. Для всех

этих популяций также были описаны как хорошо консолидированные стада, так и гетерогенные. Для тувинской короткожирнохвостой овцы выявлялись два типа внутри одной породы, что соответствует и фенотипическим данным. Для анализа генофондов всех перечисленных видов сельскохозяйственных животных использовали ISSR-маркеры, созданные на основе AG- и GA-динуклеотидных микросателлитных повторов.

Наиболее интересным и ранее мало изученным уровнем анализа стал внутривидовой или внутривидовый уровень. С этой целью были проведены исследования данных ISSR-фингерпринтинга популяций тувинской короткожирнохвостой овцы.

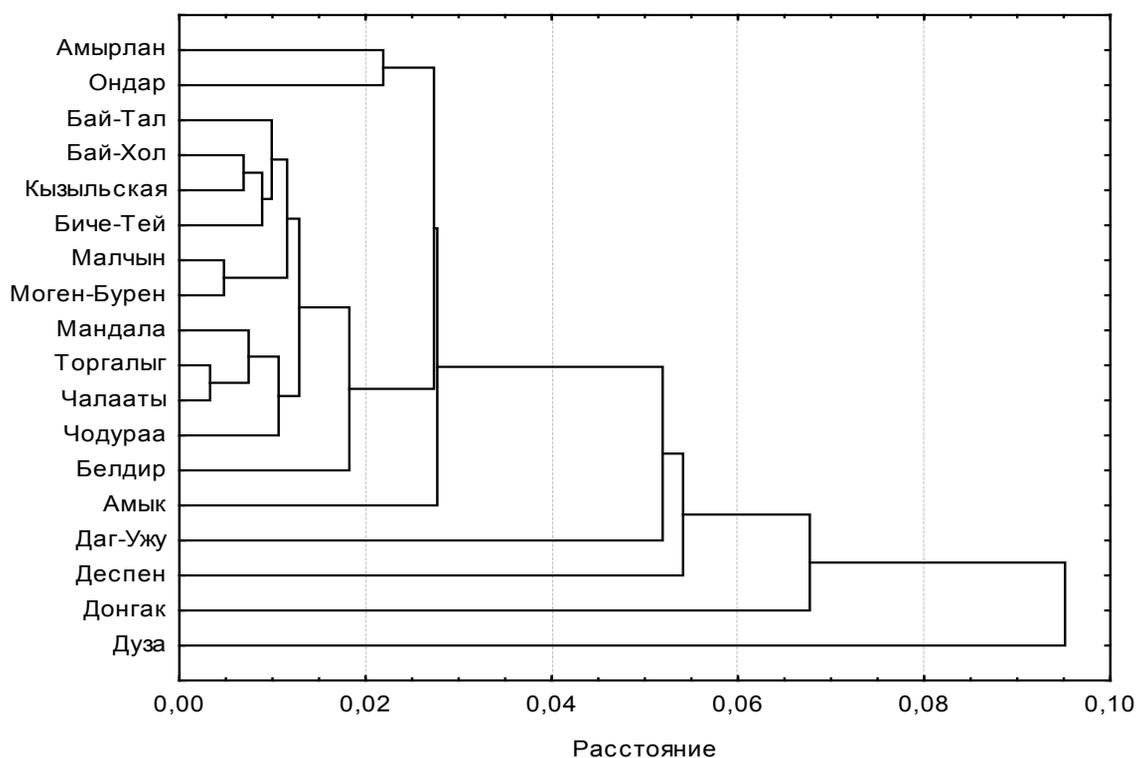


Рис. 3. Дендрограмма, характеризующая генетические взаимоотношения внутривидовых групп тувинской короткожирнохвостой породы овец из разных хозяйств по маркеру $(AG)_5C$ в диапазоне длин фрагментов ДНК 300-2100 п.н.

Деревья построены методом UPGA на основе генетических расстояний по М. Nei [16].

Разработанная система ISSR-маркеров может быть использована для идентификации

отдельных линий в исследуемых стадах, оценки чистоты линий, выявления линейной принадлежности индивидуальных животных (табл. 2, рис. 4).

Таблица 2

Характеристика линий ярославской породы по AG-ISSR и GA-ISSR-маркерам

Хозяйства	Линии	$(AG)_5C$					$(GA)_5C$					
		N	СЧФ	ДПФ	СПС	H_s	N	СЧФ	ДПФ	СПС	H_s	
Михайловское	Марга	25	15.28±0.34	0.34	0.90	0.13	25	9.20±0.13	0.08	0.93	0.06	8
	Жилета	8	15.25±0.37	0.09	0.92	0.06	9.50±1.05	0.47	0.77	0.25		
Горшиха	Вольного	12	14.58±0.42	0.23	0.88	0.12	13	10.77±0.26	0.20	0.95	0.07	
	Мурата	12	16.00±0.21	0.08	0.94	0.05	12	10.25±0.25	0.15	0.89	0.09	
	Доброго	6	14.50±1.34	0.42	0.83	0.20	9	9.67±1.34	0.11	0.92	0.07	

Примечания: N – размер выборки, СЧФ - среднее число фрагментов; ДПФ - доля полиморфных фрагментов, СПС - среднее попарное сходство, H_s - гетерозиготность по Stephens.

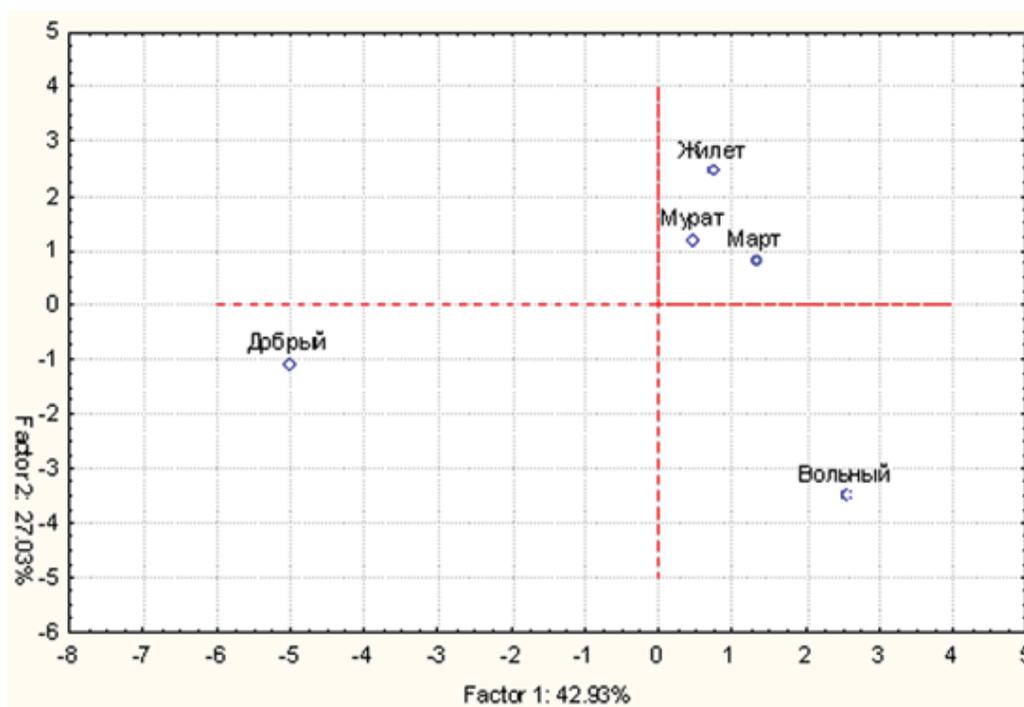


Рис. 4. Идентификация линий ярославской породы КРС на основе анализа данных по AG-ISSR-маркерам с использованием метода главных компонент. Расположение проекций наблюдений на плоскости первых двух главных компонент.

С помощью данного подхода хорошо дифференцируются даже линии животных из одного хозяйства: линии Вольного, Мурата и Доброго из хозяйства «Горшиха» Ярославской области. Таким образом, разработан-

ная нами система ДНК-маркеров позволяет идентифицировать внутривидовые линии и оценивать чистоту линий, что важно при проведении селекционной работы по поддержанию чистоты линий.

Заключение

Таким образом, полученные нами данные показывают, что метод ISSR-фингерпринтинга, в сочетании с программой STRUCTURE V2.2, могут быть использованы для решения нескольких задач: во-первых, для проведения молекулярно-генетической экспертизы по видовой и породной принадлежности животных; во-вторых, для определения характеристик породы (популяции): однородности, консолидации, чистоты и соответствия отдельных особей генофонду породы; в-третьих, для определения генеалогических связей популяций, их внутри- и межпопуляционных взаимоотношений.

В недавнем прошлом во многом эмпирический анализ различий и сходства domesticiрованных видов животных, а также консолидации и чистоты пород, благодаря математическим и молекулярно-генетическим методам трансформировался в инструмент, который позволяет на-

глядно демонстрировать специфичность видов, пород, а главное получать ясные математические критерии, например, по взаимоотношениям сходства особей с генофондом популяции. Ценность предложенного метода заключается в том, что он может значительно облегчить работу селекционера по поддержанию чистоты и консолидации стада, его породного стандарта, а также стать основой для различных селекционных стратегий. Например, контроль (генетический мониторинг) за сохранением «древнего типа» породы или за развитием желательного для селекционера типа животных. Анализ спектров продуктов позволил выявить меж- и внутривидовые отличия по ISSR маркеру с использованием праймера (AG)₆C. Расширение спектра праймеров, с учетом геномной структуры различных видов, позволит получать более разнообразный спектр ПЦР-продуктов. При

накоплении данных по ISSR-фингерпринтингу геномов сельскохозяйственных видов возможно получить математические критерии для оценки консолидации пород, а также сформулировать понятия «синтетическая» и «чистопородная» группа животных с учетом данных молекулярной генетики. Уже сегодня мы можем определять видовую и породную принадлежность «анонимных» популяций по 10 видам одомашненных животных. Исследование большего числа видов и пород будет способствовать созданию банка данных по их геномным характеристикам, что позволит характеризовать и изучать протогенофонд, современный генофонд, эрозию и гене-

тическую изменчивость геномов, определять тактику и стратегию сохранения и разведения пород и видов domesticiрованных животных, а также в необходимых случаях видовое происхождение товарных продуктов животноводства.

Работа выполнена при поддержке подпрограммы Президиума РАН «Генофонды и генетическое разнообразие», Госконтракта 02.740.11.0281 в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», гранта РФФИ 09-04-90217, а также гранта поддержки ведущих научных (НШ-4442.2010.4).

Список используемых источников

1. Генофонды отечественных пород – национальное богатство России / Ю.А. Столповский, И.А. Захаров // Вісник Інституту тваринництва центральних районів УААН, Дніпропетровськ. – 2009. – Вип. 5. – С. 124–141.
2. Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers / D. Tautz // Nucleic Acids Res. – 1989. – Vol. 17, № 16. – P. 6463–6465.
3. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction / J.L. Weber, P.E May // Am. J. Hum. Genet. – 1989. – Vol. 44, № 3. – P. 388–396.
4. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers / J. Welsh., M. McClelland // Nucleic Acids Res. – 1990. – Vol. 18. – P. 7213–7218.
5. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / I. Williams [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1990. – Vol. 18. – P. 6531–6535.
6. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos [et al.] // Nucl. Acids Res. – 1995. – Vol. 23, № 21. – P. 4407–4414.
7. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)–anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz [et al.] // Genomics. – 1994. – Vol. 20. № 2. – P. 176–183.
8. ISSR–PCR в дифференциации генофондов пород крупного рогатого скота / А. Городная, В. И. Глазко // Цитология и генетика. – 2003. – № 1. – С. 61–67.
9. Polymorphism of ISSR–PCR markers in Tuvinian population of reindeer Rangifer tarandus L / N.V. Kol, O.E. Lazebny // Genetika. – 2006. – Vol. 42 – P. 1731–1734.
10. Анализ генетической изменчивости и филогенетических связей у популяций тувинской короткожирнохвостой овцы с использованием ISSR–маркеров / Ю.А. Столповский [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 6. – С. 34–43.
11. Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting / R. Negrini [et al.] // Anim Genet. – 2007. – Vol. 38. – P. 60–66.
12. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds / N. A. Rosenberg [et al.] // Genetics. – 2001. – Vol. 159. – P. 699–713.
13. Genetic diversity and introgression in the scottish wildcat. / M. Beaumont [et al.] // Molecular Ecology. – 2001. – Vol. 10. – P. 319–336.
14. Сулимова, Г.Е. Мониторинг генофондов популяций животных в связи с задачами селекции и изучением филогении / Г.Е. Сулимова, Ю.А. Столповский, М.А. Рузина, И.А. Захаров–Гезехус // Биоразнообразии и Динамика генофондов. – Москва, 2008. – С. 211–214.
15. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Pritchard [et al.] // Genetics. – 2000. – Vol. 155. – P. 945–959.
16. Nei, M. Genetic distance between populations / M. Nei // Amer. Nature. – 1972. – № 949. – P. 283–292.
17. Association mapping in structured populations. / J.K. Pritchard [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2000. – Vol. 67. – P. 170–181.

Дата поступления статьи 22 ноября 2011 г.

А.М. Свирщевская, Л.В. Милько, А.В. Кильчевский

АНАЛИЗ RAPD СПЕКТРОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.) И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИСПОЛЬЗОВА- НИЯ МЕТОДА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЕЕ ФОРМ

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

Введение

Идентификация и паспортизация сортов, линий, гибридов - важные элементы селекционной работы с сельскохозяйственными культурами. Для создания генетических паспортов необходимы наследуемые генетические маркеры. Система молекулярных маркеров, применяемая для этой цели, должна представлять различные области генома, иметь высокий уровень межсортового полиморфизма, воспроизводимости и технологичности. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA, или полиморфизм длины амплифицированных фрагментов ДНК с использованием случайных праймеров) маркеры относят к ранним поколениям геномных ДНК маркеров, основанных на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). Суть метода заключается в амплификации фрагментов ДНК, наработанных с помощью набора олигонуклеотидных случайных праймерных последовательностей и без рестрикции и последующем анализе полученных при электрофоретическом разделении в агарозном геле спектров полос-ампликонов [1]. Эта технология используется для выявления генетического разнообразия в популяциях, построения генетических карт, определения генетического родства, идентификации клонов, линий, сортов и гибридов сельскохозяйственных растений [2, 3]. У сахарной

свеклы (*Beta vulgaris* L.) RAPD маркеры вместе с RFLP маркерами были успешно применены для построения первых генетических карт хромосом [4, 5], для подтверждения сцепления морфологических маркеров окраски гипокотыля (гены R и Y) и сроков зацветания (ген В – однолетность / двухлетность) на хромосоме 2 и картирования генов устойчивости к нематод [6, 7]. Помимо этого, были идентифицированы RAPD маркеры, ассоциированные с геном восстановителем фертильности для нового типа цитоплазматической мужской стерильности у дикой свеклы *Beta maritima* [8]. Известна только одна публикация, посвященная использованию данной технологии с целью определения генетического сходства между сортами сахарной свеклы европейской селекции и их дифференциации на основе данных RAPD анализа [9].

В данной экспериментальной работе была поставлена задача исследовать генетический материал сахарной свеклы различного происхождения и уровня ploидности с помощью RAPD маркеров, проанализировать вариабельность полученных геномных спектров и оценить возможности использования метода для идентификации форм этой перекрестноопыляемой сельскохозяйственной культуры.

Материалы и методы исследования

Материал на первом этапе опытов включал 20 образцов сахарной свеклы различного происхождения и уровня ploидности. Среди них 12 линий гиногенетического происхождения: Бц 40 СУГ 35РК 300Gu; Янаш-2; Янаш-2(2);

Бел 69 – I -7 (4); Бел 69- I; Бел 69- I 300Gu; Бел 69- 3 К; Бел 69- 3 (5); Бел 69- 3 (7); Бел 69- 3 (12); Бел 69- 3 (14); Бел 69- 3 (15); 4 селекционных линий: 8138 (4х); 81678 (4х) белорусской, «Однолетняя» украинской

и МС 193 немецкой селекции;

2 сорто-популяции белорусской селекции: Белорусская односемянная 69 (2х) и Ганусовская односемянная 55(2х) и 2 гибрида совместной немецко-белорусской селекции Белдан (3х) и Кавебел (3х).

ДНК линий были представлены смесью образцов ДНК листьев от 10 растений, сортов и гибридов – от 20 растений, а при оценке внутрисортовой и внутрилинейной изменчивости – 20 образцами ДНК листьев от 20 индивидуальных растений.

Значительную часть изученного материала составляли линии сахарной свеклы гиногенетического происхождения, созданные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [10]. Они были получены с использованием донорных растений диплоидных сортов Белорусская односемянная 69, Белоцерковская односемянная 40, Янаш АЗ. Исследованные гиногенетические линии формировались в культуре *in vitro* как регенеранты из неоплодотворенных семяпочек диплоидных свекольных растений конкретного сорта. Вегетативные побеги таких линий сахарной свеклы культивировали на питательных средах для микрклонального размножения [11]. В эксперименты были включены также тетраплоидные селекционные линии 81678 и 8138, предоставленные сотрудниками Опытной научной станции по сахарной свекле (г. Невиж) и диплоидные линии «Однолетняя», предоставленная сотрудниками ВНИИ по сахарной свекле (г. Киев, Украина) и МС 193 (компания KWS, Einbeck, Германия).

На этапе работы с популяциями генетический материал включал только диплоидные формы: гиногенетические линии Янаш КУГ РК, Белоцерковская односемянная 40 СУГ, Ганусовская односемянная 55- 9(2), Верхнячская 103 ДГ и диплоидный сорт-стандарт сахарной свеклы для Беларуси Белорусская односемянная 69.

ДНК выделяли из листьев побегов, культивируемых *in vitro* и/или из тепличных растений первого года вегетации. Выделение ДНК (смесь образцов в одной пробе) проводили с использованием протеиназы К, а экстракцию ДНК для экспериментов с популяциями растений – SDS-методом, следуя протоколу [12].

Метод RAPD включает два основных этапа. Первый этап представляет собой полимеразную цепную реакцию ДНК с использованием одного случайного короткого (обычно декамерного) праймера с преобладающим GC составом (60-80%) и низкими температурами отжига. Второй этап – фракционирование фрагментов ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле для выявления полиморфизма продуктов амплификации. Как правило, использование одного случайного RAPD праймера приводит к появлению спектра из 3-10 полос-ампликонов, которые представляют разные локусы генома [2].

Для амплификации применяли прибор «MJ Mini Personal Thermal Cycler BIO-RAD». Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 20 мкл содержала деионизированную воду, реакционный буфер без $MgCl_2$ (Dialat Ltd), 3 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ дНТФ, 40 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы.

Амплификацию с праймерами проводили в следующем режиме: первый цикл с денатурацией при 94°C в течение 2 мин 12 сек, отжигом при 39°C в течение 2 мин, элонгацией при 72°C в течение 2 мин, затем 35 циклов, включающих денатурацию при 94°C в течение 40 сек, отжиг при 47°C в течение 1 мин 40 сек и элонгацию при 72°C в течение 1 мин 30 сек. Последняя элонгация – 7 мин при 72°C. Анализ продуктов амплификации проводили в 2%-ном агарозном геле с 1 х ТАЕ буфером после электрофоретического разделения в течение 3,5 часов при напряжении 80 В. Для определения длины фрагментов использовали маркер М – 100 bp +1,5 Kb DNA Ladder (Fermentas).

Для выяснения степени воспроизводимости результатов амплификацию с каждым из праймеров и разделение продуктов амплификации в агарозном геле проводили 2-3 раза. Полосы в полученных RAPD спектрах подсчитывались в каждом из гелей (один гель – результат одного эксперимента). Данные для каждого генотипа записывали в виде бинарных матриц, в которых значения «1» и «0» соответствовали наличию или отсутствию фрагментов с одинаковой молекулярной массой в спектре. Для построения дендрограмм использовали компьютерную программу TREECON [13] с расчетом значений бутстрепа [14].

Результаты и обсуждение

Обычно в геноме имеется несколько участков, гомологичных последовательности RAPD праймера в обеих цепях ДНК, поэтому один и тот же олигонуклеотид, взаимодействуя с противоположными цепями ДНК, может служить в качестве как прямого, так и обратного праймера. При расстоянии между участками «правильной посадки» праймера от 200 п.н. и, как правило, не более 2000 п.н. будет происходить амплификация фрагментов с разных участков генома. Различия в продуктах амплификации у разных генотипов могут наблюдаться в результате мутаций в сайтах связывания с праймером или в результате перестроек хромосом [1]. Среди работ по применению данной технологии у свеклы наиболее близким по поставленной нами задаче дифференциации ее генотипов было исследование авторов из Великобритании о возможности идентификации сортов сахарной свеклы с помощью RAPD профилей [9]. В нем 17 растений 7 сортов (по 2-3 отдельных растения от каждого сорта) были проанализированы с применением 10 случайных праймеров, а затем для 15 растений от 2 сортов сахарной свеклы была оценена внутри- и межсортная изменчивость по 5 лучшим праймерам, выявившим наибольшее количество полиморфных RAPD локусов. Последовательности случайных RAPD праймеров, использованных для этой культуры в ней указаны не были, поэтому в наших экспериментах применяли серию из 10 праймеров P, приведенную в работе с подсолнечником [15], которые обозначили как Pa, Pb, Pc, Pd, Pe, Pf, Pg, Ph, Pi и Pj, характеристика которых приведена в таблице 1.

Характеристика RAPD спектров сахарной свеклы (в пробе - смесь образцов ДНК отдельных растений)

На первом этапе экспериментов стояла задача выявить праймеры, с помощью которых обнаруживаются полиморфные локусы RAPD спектров у разнородного генетического материала сахарной свеклы (линий и гибридов различного происхождения и уровня пloidности). Как и в работе британских авторов [9], нами были использованы 10 случайных праймеров, которые были оценены по их способности выявлять полиморфизм в локусах полученных спектров и по способности воспроизводить эти

спектры. На этой основе пять - шесть лучших из них были отобраны для дальнейшей работы с сахарной свеклой с целью идентификации ее форм. Полиморфные локусы были выявлены при анализе 20 генотипов сахарной свеклы с использованием 6 (Pa, Pc, Pe, Pf, Ph и Pj) из 10 произвольных праймеров (таблица 1), при этом проба генотипа была представлена смесью ДНК 10 индивидуальных растений в случае линии, 15 – в случае гибрида и 20 растений в случае сорта. Продукты ПЦР представляли фрагменты ДНК размером от 350 п.н. до 2700 п.н. Количество учитываемых ампликонов в геномных RAPD спектрах варьировало в зависимости от праймера от 3 до 15, число полиморфных локусов – от 1 до 9. Всего в данной выборке из 20 генотипов при указанном типе пробы и использовании 10 праймеров было проанализировано 79 RAPD локусов, доля полиморфных из них составила 36,7%. Спектры фрагментов с RAPD праймерами Pb, Pd, Pg, Pi были одинаковыми для всех генотипов и для целей идентификации не могли быть использованы.

В качестве примеров разделения продуктов амплификации в агарозном геле на рисунках 1 и 2 приведены электрофореграммы с полосами-ампликонами у 20 различных генотипов сахарной свеклы, полученными методом RAPD с двумя случайными праймерами. Анализ фореграммы 1 (праймер Ph, 11 генотипов из 20) показывает, что триплоидный гибрид Кавебел (образец 2), линий 8138 (4x) (образец 3) и 81678 (4x) (образец 4), которые были использованы в качестве компонентов для его создания, и линия Янаш-2 (образец 8) имеют ампликон одного размера – 1300 п.н. Известно, что во всех этих образцах присутствует генетический материал польского сорта Янаш А3. Линия «Однолетняя» украинской селекции характеризуется уникальным ампликоном размером 850 п.н. (образец 5), отличающим ее от всех других образцов. Размеры фрагментов амплификации определены с помощью программы Quantity One. Подсчет полос проводился в интервале 700-1500 п.н., обозначенном на рисунках скобкой. RAPD спектры диплоидных сортов Белорусской односемянной 69 и Ганусовской односемянной 55 – стандартов сахарной свеклы для Белару-

си (образцы 10 и 11) выглядят идентичными при амплификации с данным праймером Ph.

На фореграмме 2 (праймер Pj, 9 оставшихся из 20 генотипов под номерами 2-10,) образцы 5 и 8 - Белорусская односемянная 69-3 и гиногенетическая линия на ее основе Белорусская односемянная 69-3(12) соответственно имеют

не две, как остальные близкородственные генотипы, а только одну полосу размером 1200 п.н. Спектр продуктов амплификации с праймером Pj линии Бел 69 3(15) (образец 10) по сравнению с другими линиями на основе Белорусской односемянной 69 характеризуется отсутствием полосы размером 950 п.н.

Таблица 1

Характеристика серии из 10 RAPD праймеров Pa-Pj, использованных для выявления молекулярно-генетического полиморфизма между линиями, сортами и гибридами сахарной свеклы, и детектируемых с их помощью RAPD локусов

Праймер	GC состав, %	Размер ПЦР фрагментов, п. н.	Количество		
			Анализируемых генотипов	Детектируемых RAPD локусов	Полиморфных RAPD локусов
Pa	60	450-2500	20	9	7
Pb	60	700-1300	20	6	0
Pc	46	500-1400	20	4	1
Pd	70	1000-1300	20	6	0
Pe	60	350-2000	20	15	4
Pf	90	650-2700	20	12	5
Pg	70	800-1300	20	7	0
Ph	80	700-1500	20	10	9
Pi	60	850-1500	20	3	0
Pj	50	700-1300	20	7	3
Всего локусов				79	29

Доля полиморфных локусов от общего числа детектируемых во всех RAPD спектрах инициированных с использованием 10 праймеров Pa-Pj в общей выборке из 20 генотипов (проба в виде смеси индивидуальных образцов ДНК) составила 36,7 %.

В рассматриваемую выборку образцов сахарной свеклы входили как группа близкородственных генотипов (сорт Белорусская односемянная 69 и производные от нее линии), так и смесь форм сахарной

свеклы разного уровня ploидности (2x, 3x, 4x) и происхождения. Всего в этом генетическом пуле было детектировано 79 RAPD локусов, 29 из которых были полиморфными (табл. 1).

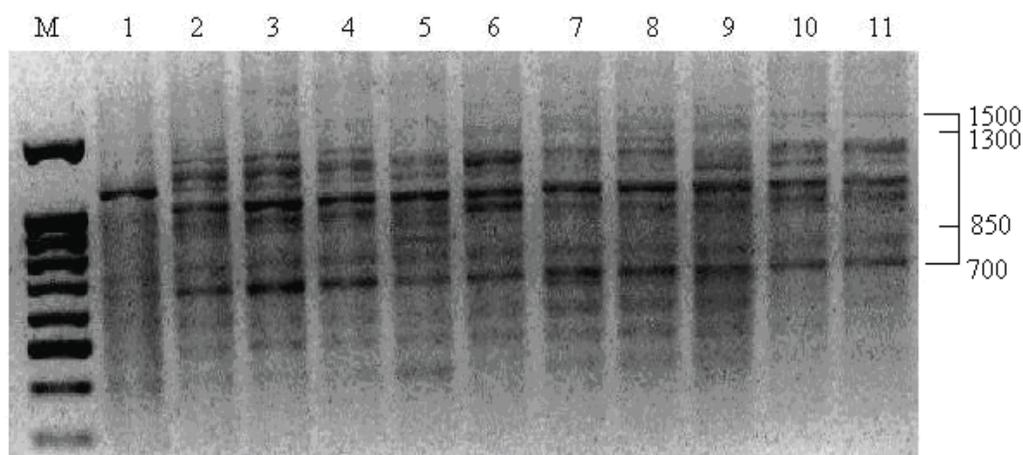


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК различных форм сахарной свеклы с праймером Ph (представлены 11 генотипов из 20)

М- маркер 100 bp+1.5Kb; 1- Белдан (3x), 2- Кавебел (3x), 3- 8138 (4x), 4-81678 (4x), 5- Однолетняя, 6- МС 193, 7- Бц 40 СУГ (35)РК 300Gy, 8- Янаш-2, 9- Янаш-2(2), 10- Бел 69 (2x), 11- Ган 55 (2x).

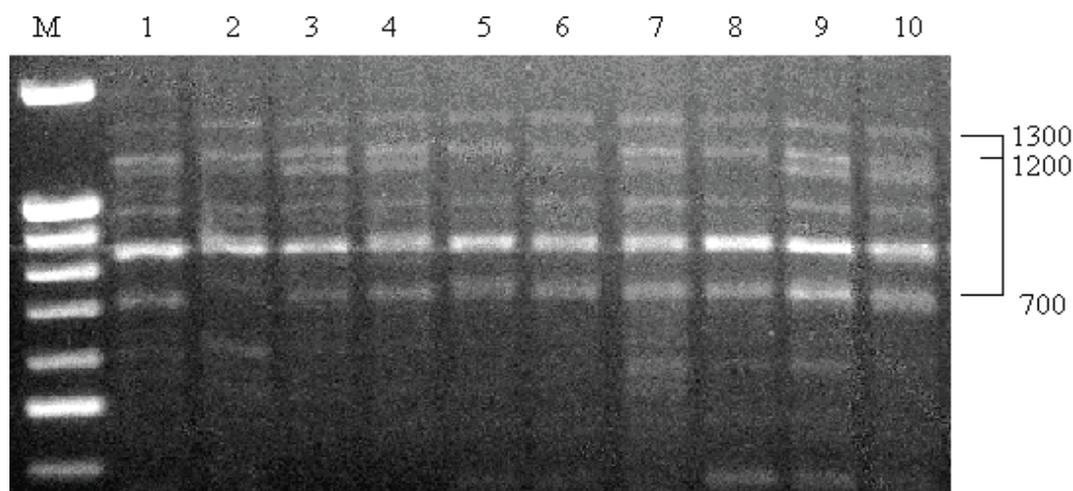


Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК гиногенетических линий сорта сахарной свеклы Белорусская односемянная 69 (2x) с праймером Pj (под номерами 2-10 представлены остальные 9 генотипов из 20).

М- маркер 100 bp+1,5Kb; 1- Бел 69 (2x), 2- Бел 69 – I-7 (4), 3- Бел 69–I, 4- Бел 69- I 300Gy, 5- Бел 69- 3 К, 6- Бел 69- 3 (5), 7- Бел 69- 3 (7), 8- Бел 69- 3 (12), 9- Бел 69- 3 (14), 10- Бел 69- 3 (15), 11- 81678 (4x).

Данные спектров фрагментов ДНК 20 генотипов сахарной свеклы, полученных с использованием серии из 10 праймеров, легли в основу расчета показателя полиморфизма RAPD локусов, выявления среди них 5 наиболее информативных (праймер Pс был исключен из группы как наименее технологичный) и построения дендрограмм, группирующих с определенной степенью вероятности близ-

кие по генетическим расстояниям генотипы в кластеры.

При сравнении спектров RAPD локусов в выборке только близкородственных генотипов, например, образцов сорто-популяции Белорусской односемянной 69 и девяти производных от нее линий (гиногенетических и селекционных), полученных с использованием праймеров Pa, Pe, Pf, Ph и Pj, полиморфизм локусов составил

33.9 % (из 53 детектируемых RAPD локусов 18 были полиморфными) [16]. Таким образом, наиболее информативные случайные праймеры из набора изученных были выявлены, уровень полиморфизма RAPD локусов в различных по составу выборках генотипов с образцами ДНК в виде смеси рассчитан и оценен как достаточно высокий и представляющий основу для дифференциации. Если на электрофореграммах обнаруживали специфичные ампликоны для группы образцов, как, например, в случае с гибридом Кавебел и линиями 8138 и 81678, входивших в состав его компонента-опылителя, то при кластеризации эти генотипы могли быть объединены в единый узел.

После завершения методического этапа сосредоточились на работе с линейным материалом сахарной свеклы и обработке полученных данных RAPD фингерпринтинга. Для построения дендрограмм, отражающих генетическое сходство, были составлены бинарные матрицы, характеризующие присутствие или отсутствие ампликонов в RAPD локусах генотипов свеклы различного происхождения. Важными показателями, характеризующими вероятность объединения генотипов в кластер, являлись значения бутстрепа, поскольку при статистически достоверной кластеризации они должны быть более 50%.

На рисунке 3 отражена картина кластеризации на основе оценки RAPD локусов 11 фертильных линий различного происхождения и пloidности, входивших в выборку генотипов на первом этапе экспериментов (в пробе – смесь образцов ДНК растений). Интерпретация расстояний показывает, что линия «Однолетняя» украинской селекции является наиболее генетически дистанцированной от остальной группы линий белорусской селекции на основе сорта Белорусской односемянной 69 и линий 8138 и 81678. Эти две тетраплоидные линии, созданные на основе сорта Янаш, и две гаплоидные линии Бел 69-3(12) и Бел 69-3(14) гиногенетического происхождения достоверно (бутстрепа более 50%) кластеризуются. При построении дендрограмм с использованием других типов маркеров, например, микросателлитов, и на более репрезентативных выборках, включающих линейный и гибридный материал сахарной свеклы разного уровня пloidности, полученный из генетически отдаленных источников, нами

также было отмечено формирование с высокой вероятностью кластеров из генотипов одинакового уровня пloidности, отличного от исходного диплоидного; кроме этого, при микросателлитном анализе было показано, что генотипы, прошедшие стадию семенной репродукции, не «смешивались» с образцами, которые ее не прошли [17]. При RAPD анализе эта тенденция кластеризации генотипов по уровню пloidности (x, 4x) подтверждается, а по способу репродукции отмечена, но не всегда является очевидной. На рисунке 3 выделяется кластер из трех генотипов на основе компонента Бел 69-1, отселектированного на Опытной научной станции по сахарной свекле (г. Несвиж) из сорто-популяции Белорусская односемянная 69 по группе признаков продуктивности, и прежде всего, сахаристости. Следует отметить, что не все линии на основе сорта Белорусская односемянная 69 попали в один кластер. В целом же для данной группы линий сахарной свеклы шкала генетических дистанций мала, поскольку кроме «Однолетней» линии и двух гаплоидных линий (x), все остальные генотипы «укладываются» в минимальное расстояние «0.1», а значения бутстрепа более 50% встречаются лишь в половине кластеров. Возможным объяснением невысоких значений бутстрепа могут служить уникальные, редкие аллели RAPD локусов, которые могут снижать вероятность кластеризации близких в генетическом отношении генотипов.

Для того, чтобы идентифицировать сорта, необходимо выполнение нескольких условий: выявляемой изменчивости между сортами, минимальной внутрисортовой изменчивости, экспериментальной воспроизводимости полученных данных. Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) – перекрестно-опыляемая культура, и несмотря на то, что большинство современных сортов представляют собой F1 гибриды, получаемые на основе ЦМС, свекольные сорта далеки от генетической выровненности/однородности. Одновременно с межсортовой изменчивостью наблюдается значительная внутрисортовая изменчивость, выявленная с помощью анализа различных изоферментных систем, и которая представляет сложности для идентификации свекольных форм [18]. Ранее нами была проанализирована внутрисортовая изменчивость сорта Белорусская

односемянная 69 – стандарте для диплоидных форм сахарной свеклы в РБ, с использованием отобранных 5 праймеров. Генотип сорта мог быть представлен в анализе как в виде одного образца из смеси листьев 20 растений, так и в виде популяции из 20 образцов ДНК индивидуальных растений. Средний уровень полиморфизма RAPD локусов в спектрах сорта в первом случае составил 36,3 %, а во втором – 44,6 %. Эти данные продемонстрировали, что популяционный анализ в ряде случаев позволяет детектировать большее количество полиморфных локусов [16].

Поскольку внутривидовая изменчивость сорта-стандарта Белорусская односемянная 69, выявленная с использованием отобранных в ходе экспериментов RAPD праймеров,

оказалась высокой, в дальнейшем для изучения был взят предположительно более выровненный в генетическом плане материал сахарной свеклы – линейный. Но даже в группе из 9 близкородственных линий геногенетического происхождения и их донорного сорта Белорусская односемянная 69 средний уровень полиморфизма RAPD локусов составил 33,9% и были обнаружены уникальные ампликоны для отдельных линейных генотипов. Эти результаты дали основание для использования RAPD метода с целью генотипирования геногенетических линий сахарной свеклы, но представлялось очевидным, что пяти лучших праймеров серии P, выявивших полиморфные RAPD локусы у линий сахарной свеклы было недостаточно для того, чтобы маркировать все линии свеклы данной выборки [16].

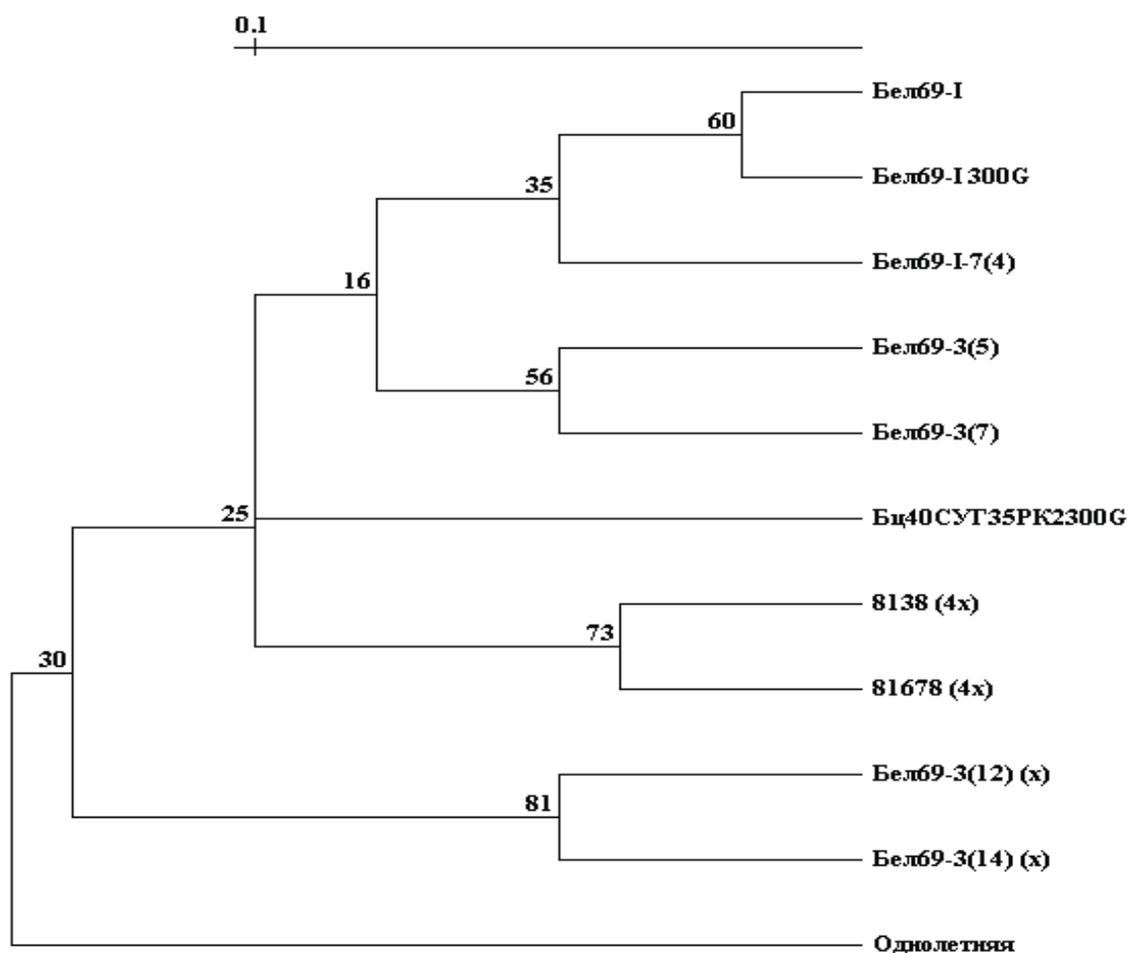


Рис. 3. Дендрограмма, отражающая генетическое сходство между 11 линиями сахарной свеклы различного происхождения и уровня плоидности. Построена на основе анализа 53 RAPD локусов

II. Характеристика RAPD спектров сахарной свеклы (популяционный анализ)

После изучения геномных RAPD спектров на материале близкородственных линейных генотипов сахарной свеклы для целей идентификации перешли к анализу внутрипопуляционной изменчивости у диплоидных гиногенетических линий, индуцированных в культуре семян растений от сортов польской, украинской, белорусской селекции и представляющих различные селекционные направления (урожайное-Верхняячская 103, сахаристое-Янаш А3 и смешанного типа). Оценка внутрипопуляционной изменчивости является необходимым этапом при идентификации и паспортизации растений с помощью ДНК маркеров. Изучали популяции линий Ганусовской 55-9(2), Белоцерковская 40 СУГ, Верхняячская 103 ДГ, Янаш СУГ РК. Каждая линия была представлена популяцией из 15 образцов ДНК индивидуальных растений. Контрольной популяцией являлась сорто-популяция Белорусской односемянной 69, состоящая из 20 растений. Спектры, полученные при амплификации с праймерами Pa, Pb, Pc, Pq и Pi, были либо мономорфными, либо слабо воспроизводимыми, остальные 5 праймеров (таблица 2) давали спектры с полиморфными RAPD локусами, свидетельствующие о гетерогенности исследуемых растений линий сахарной свеклы по отдельно взятым амплифицированным фрагментам ДНК. Применение праймеров Pd, Pe, Pf, Ph и Pj давало в спектре от 3 до 13 ампликонов, длина фрагмента ДНК зависела от праймера и колебалась, в основном, в интервале 350-1500 п.н. На рисунке 4 и 5 представлены примеры амплификации ДНК исследуемых линий Янаш КУГ РК и Верхняячская 103 ДГ с праймером Ph. Максимальное количество ампликонов получили при амплификации с праймером Pe. Процент полиморфизма амплифицированных фрагментов генома определяли как отношение количества полиморфных фрагментов к общему количеству полученных фрагментов. Было установлено широкое варьирование количества полиморфных RAPD локусов у исследуемых

линий сахарной свеклы в зависимости от используемых праймеров – от 30% до 80%. В среднем уровень полиморфизма RAPD локусов для изученной выборки из 5 популяций (4 гиногенетических линии и 1 сорт, всего 80 растений) составил 54,5 % (табл. 2).

Полученные с праймерами Pe, Pf, Ph, Pj профили подтвердили предположение о том, что в ряде случаев возможно выявление более высокого уровня полиморфизма RAPD локусов при исследовании популяций растений образца, чем при анализе спектров, полученных с использованием проб, состоящих из смесей ДНК растений этого же образца свеклы. Причиной этого могут быть количественные различия в пробе при использовании смеси листового материала, приводящие к не 100%-ному связыванию праймера с соответствующими сайтами ДНК, а последующие циклы амплификации увеличивают эти различия, выражающиеся в отсутствии ряда ампликонов. В целом же, изменение RAPD-спектра, т. е. исчезновение или появление новой полосы ДНК, отражает различные изменения генома, например, мутацию в участках, узнаваемых праймером, или делецию/инсерцию в промежутке между такими участками [19]. RAPD-спектры могут также видоизменяться вследствие конкуренции за участки присоединения праймеров, на которую влияют перестройки и амплификация некоторых участков генома [20]. В любом из случаев высокий уровень полиморфизма ДНК свидетельствует о значительной изменчивости исследуемых растений сахарной свеклы внутри линейной популяции, полученной в культуре *in vitro* и прошедшей семенной цикл репродукции.

На основе данных RAPD анализа изученные линии и сорт были кластеризованы с помощью программы TREECON. Дендрограмма генетического сходства исследуемых генотипов сахарной свеклы приводится на рисунке 6. Построенная методом UPGMA, она состоит из четырех основных кластеров: группа I (Янаш КУГ РК, Белоцерковская 40 СУГ), группа II (Ганусовская 55), группа III (Верхняячская 103 ДГ) и группа IV (Белорусская 69).

Таблица 2

Результаты RAPD анализа по выявлению внутривидовой изменчивости у четырех геногенетических линий сахарной свеклы и контрольной сорто-популяции Белорусской односемянной 69

Праймер	GC состав, %	Размер ПЦР фрагментов п. н.	Количество		
			Анализируемых генотипов	Детектируемых RAPD локусов	Полиморфных RAPD локусов
Pd	70	550-1500	80	8	6
Pe	60	350-1500	80	13	5
Pf	90	470-1500	80	10	3
Ph	80	530-1350	80	10	8
Pj	50	380-1300	80	3	2
Всего локусов				44	24

Доля полиморфных локусов от общего числа детектируемых во всех RAPD спектрах инициированных с использованием 5 отобранных праймеров в общей выборке из 80 генотипов (проба - ДНК одного растения), составила 54,5 %.

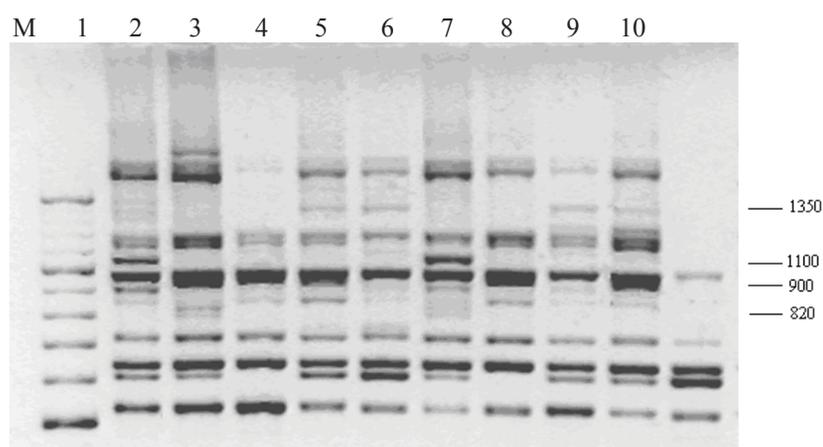


Рис. 4. RAPD-спектры амплифицированной ДНК геногенетической линии сахарной свеклы Янаш КУГРК, полученные при использовании в реакции произвольного праймера Ph. Обозначения: М - маркер 100 bp+1,5Kb; 1-10 индивидуальные образцы геногенетической линии Янаш КУГРК

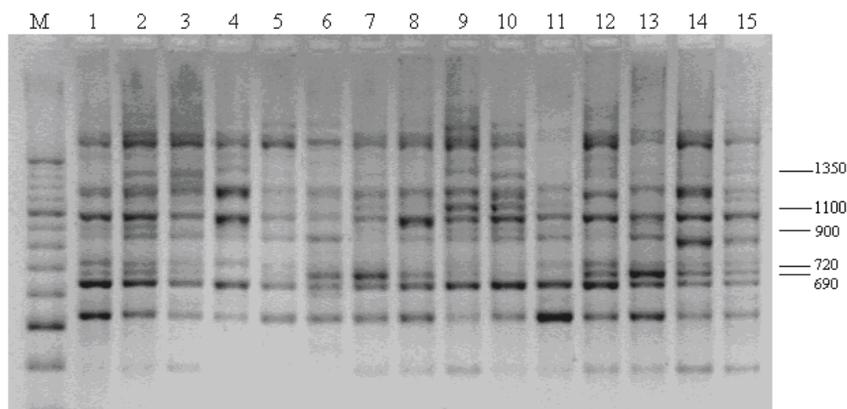


Рис. 5. RAPD-спектры амплифицированной ДНК геногенетической линии сахарной свеклы Верхняяская 103ДГ, полученные при использовании в реакции произвольного праймера Ph. Обозначения: М - маркер 100 bp+1,5Kb; 1-15 индивидуальные образцы геногенетической линии Верхняяская 103ДГ

Из приведенной дендрограммы следует, что все 20 растений контрольной сортопопуляции Белорусская односемянная 69 сформировали один кластер. Линейные популяции, каждая из которых состояла из 15 растений, сгруппированы отдельно от сорта, но значения бутстрепов невысокие, большинство из них - менее 50, за редкими исключениями. На основании рассчитанных генетических дистанций дигаплоидная линия Верхняячская 103ДГ идентифицируется как единая форма, так же, как и стандарт Белорусская односемянная 69. Все оставшиеся линии гиногенетического происхождения – Ганусовская 55 9 (2), Белоцерковская 40 СУГ и Янаш КУГ РК, также сгруппированы в отдельные узлы, что указывает на возможность их идентификации на основании полученных данных. При этом эти три линии имеют небольшие количества растений (от одного до пяти), которые выходят за рамки основного кластера линии. Это 2 растения линейной популяции Янаш КУГ РК, 3 растения (2 и 1) Ганусовской 55 9 (2), 5 (2 и 3) растения Белоцерковской 40 СУГ. Эти указанные, выходящие за рамки своего основного кластера, растения распознавались программой для кластеризации как растения других линий. Это может объясняться значительной изменчивостью и сложной структурой популяции каждой линии сахарной свеклы, в которой растения значительно отличаются по геномным профилям, а также недостаточно большим количеством использованных праймеров для получения геномных RAPD про-

филей с высокой степенью полиморфизма.

Анализ молекулярной вариации (АМОВА), важного статистического метода, разработанного относительно недавно для оценки иерархической структуры генетической изменчивости между популяциями и внутри популяций, а также аналога F-критерия с использованием разных типов молекулярных маркеров, в том числе RAPD маркеров и их бинарных матриц [21, 22], позволил установить, что при попарных сравнениях популяций 4 гиногенетических линий между собой и между этими линиями и сорто-популяцией стандарта Белорусская односемянная 69 в 5 случаях из 11 возможных внутривнутрипопуляционной изменчивость оказывалась большей (с диапазоном от 52 до 70%), чем межпопуляционной, что указывает на сложную структуру популяции и исследованных линий, и сорта перекрестноопыляемой сахарной свеклы. АМОВА по данным RAPD анализа из общей выборки популяций дифференцирует две формы – а) исходно гомозиготную и прошедшую 5-6 циклов семенной репродукции линию гиногенетического происхождения Бц 40 СУГ, при включении которой в попарное сравнение в 4 случаях из 5 возможных внутривнутрипопуляционной изменчивость была выше межпопуляционной и б) сорто-популяцию Белорусская односемянная 69, при включении которой в попарное сравнение в 4 из 5 возможных вариантов межпопуляционной изменчивость была выше (с диапазоном от 54 до 67%) внутривнутрипопуляционной.

Заключение

На разных по объему и составу выборках образцов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) были испытаны 10 случайных коротких олигонуклеотидных праймеров и из них отобраны 5 наиболее эффективных для получения полиморфных геномных RAPD профилей. При использовании проб в виде смеси образцов ДНК растений доля полиморфных локусов среди общего количества детектируемых варьировала между 33 и 44%. Показано, что различия регистрируются даже между геномами близкородственных линейных генотипов сахарной свеклы. При оценке генетического сходства/различия между линиями сахарной свеклы

разного происхождения и уровня пloidности на основе результатов RAPD маркирования отмечена достоверная кластеризация генотипов по уровню пloidности, отличного от исходного диплоидного (гаплоидов, тетраплоидов); этот вывод хорошо согласуется с данными проведенного нами ранее микросателлитного анализа [17].

Выявление уникальных фрагментов амплификации и высокий уровень полиморфизма локусов в полученных с помощью эффективных случайных праймеров RAPD спектрах линий сахарной свеклы подтверждает возможность использования этого метода для их

генотипирования. В то же время, при проведении более масштабных исследований и для получения более достоверных данных с целью идентификации всех форм свеклы данной выборки, количество праймеров следует увеличить. Метод технически простой и быстрый, но зачастую требует повторения как этапа амплификации, так и электрофоретического разделения фрагментов ДНК в агарозном геле для повышения точности эксперимента и интерпретации полученных данных.

В результате анализа RAPD спектров, полученных с использованием тех же праймеров с другим типом пробы (в образце не смесь, а ДНК одного растения) в популяциях сахарной свеклы (4 гиногенетических линии и 1 сорто-популяция, всего 80 растений),

был выявлен 54,5% средний уровень полиморфизма RAPD локусов во всей выборке. При этом было установлено широкое варьирование количества полиморфных локусов у исследуемых генотипов в зависимости от используемых праймеров – от 30% до 80%. Данные анализа молекулярной вариации AMOVA для 5 изученных популяций указывают на сложную структуру популяции исследованных линий и сорта сахарной свеклы. Внутрипопуляционная изменчивость линии может превышать межпопуляционную, что усложняет молекулярную идентификацию образца с помощью RAPD маркеров.

Работа была выполнена в рамках задания 3-30 Государственной Программы «Инновационные биотехнологии».

Список использованных источников

1. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений: Учебно-методическое пособие по генетике растений. Ежова Т.А. [и др.]; М.: МАКС-Пресс, 2003. – 220 с.
2. Waugh R. RAPD Analysis: Use for Genome Characterization, Tagging Traits and Mapping / R. Waugh. Plant Molecular Biology. A laboratory Manual. Ed. by M.S. Clark. Part II. Chapter 6. – Berlin: Springer Verlag, 1997. – P. 305–333.
3. Малышев, С.В. Молекулярные маркеры в генетическом картировании растений / С.В. Малышев, Н.А. Картель // Молекулярная биология. – 1997. – Т. 31. – № 2. – С. 197–208.
4. Uphoff, H. A genetic map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) based on RAPD markers / H. Uphoff, and G. Wricke // Plant Breed. – 1995. – Vol. 114. – P. 355–357.
5. Barzen, E. An extended map of sugar beet genome containing RFLP and RAPD loci / E. Barzen, W. Mechelke, E. Ritter, E. Schulte-Kappert, and F. Salamini // Theor. Appl. Genet. – 1995. – Vol. 90. – P. 189–193.
6. Uphoff, H. and G. Wricke. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Mapping the genes for nematode resistance and hypocotyls colour / H. Uphoff, and G. Wricke // Plant Breed. – 1992. – Vol. 109. – P. 168–171.
7. Shen, Y. The taxonomic characterization of annual *Beta* germplasm in a genetic resources collection using RAPD markers / Y. Shen, H.J. Newbury and B.V. Ford-Lloyd. // Euphytica. – 1996. – Vol. 91. – P. 205–212.
8. Identification and mapping of RAPD and RFLP markers linked to a fertility restorer gene for a new source of cytoplasmic male sterility in *Beta vulgaris* ssp. *Maritima* / Laporte, V. [и др.] // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 96. – P. 989–996.
9. Ford-Lloyd, B.V. The Use of RAPD for the Identification of Sugar Beet Varieties / B.V. Ford-Lloyd, M. Munthali, and H.J. Newbury // Journal of Sugar Beet Research. October–December. – 1993. – Vol. 30, N 4. – P. 291–298.
10. Svirshchevskaya, A.M. Karyological characterization of sugar beet gynogenetic lines cultured in vitro / A. Svirshchevskaya, J. Dolezel // J. of Applied Genetics. – 2001. – Vol. 42, N 1. – P. 21–32.
11. Свирицкая, А.М. Культура тканей сахарной свеклы: генет. и физиол. аспекты / А.М. Свирицкая, В.Е. Бормотов. – Мн.: Наука и техника, 1994. – 140 с.
12. Plaschke, J. Detection of genetic diversity in closely related wheat using microsatellite markers / J. Plaschke, M. Ganai, M.S. Roeder // Theor. Appl. Genet. – 1995. – V. 91. – P. 1001–1007.
13. Van de Peer, Y. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for Microsoft Windows environment / Y. Van de Peer, R. De Wachter // Comput. Appl. Biosci. – 1994. – V. 10. – P. 569–570.

14. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // *Evolution*. – 1985. – V. 38. – P. 783–791.
15. Сиволап, Ю.М. RAPD–анализ молекулярно–генетического полиморфизма подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) / Ю.М. Сиволап, А.Е. Солоденко, В.В. Бурлов. // *Генетика*. – 1998. – Т. 34, – № 2. – С. 266–271.
16. Милько, Л.В. Оценка полиморфизма ДНК гиногенетических линий и сорта Белорусская односемянная 69 сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) с помощью RAPD маркеров / Л.В. Милько, А.М. Свирщевская, А.В. Кильчевский // *Молекулярная и прикладная генетика: сборник научных трудов*. Том 10. Институт генетики и цитологии НАНБ; ред.колл.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2009. – С. 39–47.
17. Malyshev, Sergey. SSR markers assessment of genetic diversity in sugar beet lines / Sergey Malyshev, Anna Svirshchevskaya, and Nikolai Kartel. *Modern Variety Breeding for Present and Future Needs*. Eds. J.Projens & M.L. Badenes. Valencia, Spain: Editorial Universidad Politecnica de Valencia, 2008. – P. 176–177.
18. Bailey, D.C. Isozyme variation and plant breeders rights / Isozymes in plant genetics and breeding. Tanskley, S.D. and Orton, T.J. (eds). Part A. Amsterdam: Elsevier, 1983. – P. 425–441.
19. Williams, J.G.K. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers / J.G.K. Williams, M.K., Hanafey, J. A Rafalski, S.V. Tingey // *Method Enzymol*. – 1993. – V. 218. – P. 704–740.
20. Deverno L.L. Mitochondrial DNA Variation in Somatic Embryogenic Cultures of *Larix* / L.L. Deverno, P.J., Charest, L. Bonen // *Theor. Appl. Genet*. – 1994. – V. 88. – P. 727–732.
21. Excoffier L. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction sites / L. Excoffier L., P.E. Smouse, J.M. Quattro // *Genetics*. – 1992. – Vol. 131. – P. 479–491.
22. Huff, D.R. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. / D.R. Huff, R. Peakall, P.E. Smouse // *Theor. and Appl. Genet*. – 1993. – Vol. 104. – P. 388–398.

Дата поступления статьи 4 марта 2011 г.

СОЗДАНИЕ И АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА (*LINUM USITATISSIMUM* L.), НЕСУЩИХ МУТАНТНЫЙ ГЕН ТУБУЛИНА, МЕТОДОМ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

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

Введение

Современная селекция льна-долгунца ориентирована в основном на улучшение прядильных свойств льноволокна, что является определяющим фактором в конкурентной способности данной культуры. Однако необходимо совершенствовать и другие агрономические характеристики, включая устойчивость к повышенной гербицидной нагрузке. Создание генетически модифицированных растений, малотребовательных к условиям среды и невосприимчивых к гербицидам – альтернативный способ повышения продуктивности сельского хозяйства, позволяющий существенно снизить использование вредных химикатов.

Генетически измененные растения с устойчивостью к различным классам гербицидов являются наиболее успешным биотехнологическим продуктом в области растениеводства. К настоящему времени получены трансгенные растения сельскохозяйственных культур устойчивые к таким компонентам гербицидов, как глифосат (соя, рапс, томат, кукуруза), фосфинотрицин (кукуруза, рис, пшеница, хлопок, картофель, томат, сахарная свекла), хлорсульфурон (рапс, рис, томат), динитроанилины (кукуруза, хлопок). Единственная трансгенная линия льна масличного CDC Triffid на основе сорта Norlin, устойчивая к сульфонилмочевине (хлорсульфурон), создана и зарегистрирована в Канаде [1]. Следует подчеркнуть, однако, что получение трансгенных линий льна остается трудно решаемой задачей.

На сегодняшний день приблизительно четверть рынка всех гербицидов занимают соединения, обладающие антимитотическими

свойствами [2-4]. К этой группе гербицидов относятся, в том числе, и разрушители микротрубочек, такие как широко применяемые динитроанилины, в частности, трифлюралин, пендиметалин, оризалин и другие [5]. Основными эффектами данных гербицидов являются деполимеризация микротрубочек с последующим нарушением формирования веретена деления и блокированием прохождения клетками митоза [5]. Они также нарушают ориентацию кортикальных микротрубочек, что приводит к появлению клубеньковой морфологии кончиков корней из-за изодиаметрического роста клеток в зоне элонгации корня [3]. Основной мишенью действия динитроанилинов является белок тубулин [5, 6], высококонсервативный структурный компонент микротрубочек эукариотической клетки, состоящий из α - и β -субъединиц с молекулярной массой ~50-55 кДа каждая [7]. Хотя уровень гомологии аминокислотных последовательностей этого белка из различных источников достаточно высок, тубулины животных и растений характеризуются различной степенью сродства к динитроанилинам [6, 8, 9]. Именно тубулин растений связывается с данными веществами высокоспецифичным образом в низких микромолярных концентрациях. Как было показано с помощью моделирования *in silico* пространственной структуры тубулинов растений, такая особенность обусловлена наличием высокоспецифичного сайта связывания с динитроанилинами на поверхности молекулы α -тубулина, локализованного в зоне интердимерного контакта [9]. В формировании этого сайта связывания ключевая роль принадлежит

остатку аминокислоты треонина (Тре-239), замена которого на изолейцин (Иле) приводит к приобретению природной устойчивости к динитроанилину [10, 11]. Поэтому использование мутантного гена α -тубулина (*Tuaml*), изолированного из устойчивого к динитроанилину (R-биотипа) гусиной травы (*Eleusine indica* L.) [11], могло бы позволить решить

проблему устойчивости льна не только к динитроанилиновым гербицидам, но и к гербицидам из класса фосфоротиоамидов.

Цель данной работы состояла в получении трансгенных растений льна-долгунца, несущих мутантный ген α -тубулина, который обеспечивает устойчивость к гербицидам динитроанилинового класса.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали сорт льна-долгунца белорусской селекции Старт (Могилевская ОС).

Генно-инженерная конструкция была любезно предоставлена академиком Я.Б. Блюмом (Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины) и представляла собой бинарный вектор pBITUBA8, содержащий мутантный ген α -тубулина *Tuaml* из *Eleusine indica* [11] и ген β -тубулина *HvTUB1* из ячменя (*Hordeum vulgare*) [12]. Оба гена интегрированы в конструкцию под контролем промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (35S РНК CaMV) и октопинового терминатора 3'OCS [13].

Выбор селективных концентраций трифлуралина. Поскольку трифлуралин (DowElanco, Greenfield, США) является одним из наиболее эффективных представителей класса динитроанилиновых гербицидов, нами проведен анализ чувствительности клеток каллуса льна к его действию, и установлена его летальная концентрация. Концентрацию трифлуралина определяли с помощью теста *in vitro* [14, 15]. Для этого готовили 10 мМ стерильный раствор гербицида в диметилсульфоксиде и хранили при -20°C. Затем соответствующие концентрации трифлуралина (0,5-10 мкМ) добавляли в охлажденную стерильную питательную среду для каллусообразования льна.

Агробактериальная трансформация. Для трансформации льна использовали ночную культуру агробактерии, которую выращивали на среде LB [16] с добавлением 100 мг/л рифампицина и 100 мг/л канамицина при температуре 28°C и постоянном качании на орбитальном шейкере (180 об/мин). Клетки агробактерии осаждали центрифугированием (1000 об/мин) и разбавляли свежей жидкой средой МС [17] до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,5$ и инкубировали в тех

же условиях в течение 3-4 часов. Полученную суспензию применяли для инфицирования эксплантов.

В качестве эксплантов для трансформации были использованы сегменты гипокотилей пятидневных проростков льна-долгунца размером 3-4 мм, которые помещали на агаризованную среду МС-БН, и предкультивировали в течение 48 ч. Трансформацию и кокультивирование с агробактерией проводили согласно методу, описанному нами ранее [18]. Затем экспланты помещали на среду МС-БН, содержащую антибиотик клафоран в концентрации 200 мг/л для ингибирования развития колоний агробактерий и канамицин в концентрации 100 мг/л для создания селективного давления на нетрансформированные клетки. Параллельно проводили селекцию трансформированных тканей на селективных концентрациях трифлуралина по аналогичной схеме, т.е. вместо канамицина в среду культивирования вносили трифлуралин в концентрации 3 мкМ. Выжившие и регенерировавшие в селективных условиях растения переносили на безгормональную среду МС для укоренения [19, 20] и молекулярно-биологического анализа.

Молекулярно-генетический анализ. Для выделения тотальной ДНК из предположительно трансгенных побегов использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-С» (Россия). Целевые гены *Tuaml* и *HvTUB1* в используемой нами конструкции находятся под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, который можно идентифицировать с помощью праймеров к последовательности данного промотора. Для этой цели использована тест-система «АмплиСенс[®] ПЛАНТ-СКРИН». Амплификацию и последующий анализ первичных

трансформантов проводили согласно инструкции производителя.

Для подтверждения интеграции маркерного гена в геном полученных растений-регенерантов проводили ПЦР с праймерами к последовательности гена *nptII* (5'-CGACGTTGTCACCTGAAGCG-3' и 5'-AAGCACGAGGAAGCGGTCAG-3'). Размер амплифицируемого фрагмента 489 пн.

Для доказательства того, что амплификация последовательности селективного маркера происходит с геномной ДНК модифицированных растений, а не с экспрессионного вектора, который встроен в плазмиду бактериальной клетки, проводилась ПЦР с использованием

праймеров к хромосомным генам агробактерий: 5'-CATGCTCGGCCGGCTGACA-3', 5'-TGCGCAGGTCGCTTGCTTC-3'.

Реакции проходили в амплификаторе Bio-Rad при следующих условиях: шаг 1 – 2 мин при 94°C; шаг 2 – 29 циклов, 30 сек при 94°C, 1 мин при 56°C и 1 мин при 72°C; шаг 3 – 5 мин при 72°C. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле с добавлением этидиум бромид и документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя в качестве маркера GeneRuler™100 bp (1000 bp) Plus DNA ladder (Fermentas).

Результаты и обсуждение

Исследования, проведенные в Канаде [21], Великобритании [22], Словакии [23] позволили разработать различные способы и условия трансформации льна масличного. Аналогичные исследования на культуре льна-долгунца единичны в силу того, что эта культура обладает пониженной морфогенетической активностью *in vitro* по сравнению с другими разновидностями льна. Известно, что важной предпосылкой для создания успешной системы трансформации какого-то определенного вида растений является наличие высокоэффективной системы регенерации побегов в культуре *in vitro*. Ранее нами была проведена оценка морфогенетического потенциала и регенерационной способности некоторых сортов льна-долгунца, районированных в Беларуси, в культуре *in vitro* [24]. В результате был определен гормональный состав питательной среды, оптимальной для каллусообразования и регенерации растений, и отобран ряд сортов белорусской селекции, обладающих высоким регенерационным потенциалом [24]. Для данного исследования в качестве основного объекта был выбран сорт льна-долгунца Старт.

Для агротрансформации использовали сегменты гипокотилей пятидневных пророст-

ков длиной 3-5 мм, которые помещали на агаризованную среду МС-БН и предкультивировали в течение 48 ч. Наши наблюдения показали, что данный этап является обязательным при проведении агробактериальной трансформации льна-долгунца. В противном случае количество выживших эксплантов после трансформации резко снижается, а в некоторых экспериментах погибают все экспланты. Для льна-долгунца еще недостаточно хорошо разработаны методы переноса генов. Существуют лишь единичные работы по использованию агробактериальной, ПЭГ-индуцированной и биобаллистической трансформации [25, 26] для получения модифицированных растений льна-долгунца. В частности, в результате использования этих методов были созданы первичные растения-трансформанты, несущие химерные или антисмысловые встройки [25, 27, 28], а также растения льна, продуцирующие новые метаболиты [29].

Встраиваемая нами конструкция несла гены, кодирующие обе субъединицы гетеродимерного белка тубулина: мутантный ген α -субъединицы (*Tuam1*) из природного высокоустойчивого к динитроанилину биотипа гусяной травы и полноразмерный ген β -субъединицы тубулина (*HvTUB1*) из ячменя (рис.1).

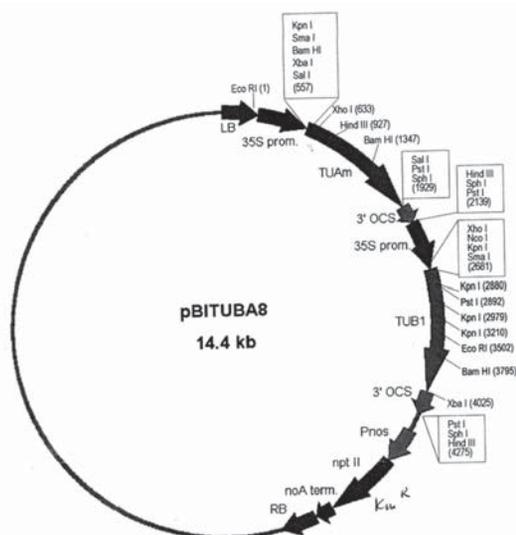


Рис. 1. Схема Т-ДНК конструкции рBITUBA8.

LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК, 35S – промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, *TuamI* – ген мутантного α -тубулина, 3' OCS – октопиновый терминатор, *HvTUB1* – ген β -тубулина, Pnos – нопаиновый промотор, *nptII* – ген устойчивости к канамицину, 3' nos – нопаиновый терминатор.

Предполагается, что наличие в конструкции двух субъединиц и их последующая эквимоллярная коэкспрессия является необходимым условием для обеспечения их корректного встраивания в нативные интерфазные или митотические микротрубочки трансформированных растений [10].

Отбор первичных трансформантов в нашем исследовании был основан на толерантности модифицированных клеток и тканей как канамицину за счет экспрессии в них гена *nptII*, так и за счет экспрессии в клетках гена мутантного тубулина, определяющего устойчивость к динитроанилину. Оптимальная концентрация селективного агента должна минимизировать процент регенерации нетрансформированных растений и максимально ограничивать

его негативное влияние на органогенез. Чаще всего концентрация канамицина при селекции трансформированных гипокотилей льна-долгунца составляет 100 мг/л [30]. В наших экспериментах большинство гипокотильных сегментов, инокулированных бактериальной суспензией и помещенных на селективную среду (Km_{100}), замедляли рост, экспланты желтели и засыхали. Однако у части эксплантов на срезах формировался и активно рос зеленый каллус плотной консистенции, что позволило предполагать получение трансформированного каллуса (рис. 2). Аналогичным способом через стадию формирования каллуса проводили регенерацию трансформированных побегов как масличного льна [22], так и льна-долгунца [30].



Рис. 2. Формирование каллуса из модифицированных клеток на селективной среде (Km_{100})

Для установления эффективной селективной концентрации динитроанилинового гербицида (трифлуралин) каллусы культивировали на твердых средах, содержащих трифлуралин в концентрациях 0,5-10 мкМ, так как ранее было показано, что динитроанилины проявляют высокую антимикротрубочковую активность в растительных клетках при достаточно низких микромолярных концентрациях [6]. В результате наших исследований установлено, что концентрация 3 мкМ является эффективной концентрацией трифлуралина для селекции

in vitro каллусов льна-долгунца. Полученные нами данные коррелируют с результатами предыдущих исследований по установлению критических микромолярных концентраций этого гербицида для других видов некоторых однодольных [15] и двудольных [31] растений.

В таблице представлены результаты эффективности морфогенеза и регенерации гипокотильных эксплантов сорта Старт после проведения агробактериальной трансформации и селекции на средах, содержащих канамицин (Km_{100}) и трифлуралин (3 мкМ) (табл. 1).

Таблица 1

Эффективность морфогенеза и регенерации после проведения агробактериальной трансформации

Селективный агент	Число эксплантов, шт.	Число выживших эксплантов, шт.	Число эксплантов, образовавших каллус, шт.	Число сформировавшихся побегов, шт.
Канамицин	191	191	109	8
Трифлуралин	163	80	59	4

При проведении селекции на среде, содержащей 100 мг/л канамицина, спустя 3–4 недели после инокуляции 191-го сегмента гипокотилей наблюдалось активное формирование каллусов по краям эксплантов. Несмотря на легкость получения каллусных тканей, получить побеги льна-долгунца после проведения трансформации не всегда удается. Тем не менее, в результате культивирования жизнеспособного каллуса на селективных средах с канамицином сформировалось 8 побегов. Соотношение количества эксплантов, образовавших каллус к количеству сформировавшихся побегов составило 7,3 %. Такой показатель эффективности агробактериальной трансформации характерен для льна [32, 33].

Селекция гипокотильных эксплантов на среде, содержащей 3 мкМ трифлуралина, была более продолжительной, чем на среде, содержащей в качестве селективного агента канамицин. Образование каллуса на эксплантах наблюдали только спустя 2-3 месяца от начала культивирования, регенерация побегов также была затруднена. Соотношение количества

эксплантов, образовавших каллус к количеству сформировавшихся побегов составило 6,7 %.

В ходе экспериментов по агробактериальной трансформации гипокотильных сегментов получено 12 первичных трансформантов льна-долгунца сорта Старт. Рост побегов на средах, содержащих канамицин или трифлуралин, является косвенным доказательством их трансгенной природы. Для подтверждения интеграции переносимых генов проведен молекулярно-генетический анализ первичных трансформантов. Поскольку α - и β -тубулины растений кодируются относительно большим количеством генов с очень схожими последовательностями, то специфическая амплификация перенесенных генов из конструкции рВITUBA8 в растения невозможна. Так как целевые гены в использованной конструкции находятся под контролем 35S промотора, нами проведена амплификация с соответствующими праймерами. Результаты анализа показали наличие фрагментов, соответствующие позитивному контролю (плазмида рВITUBA8) во всех образцах (рис. 3).

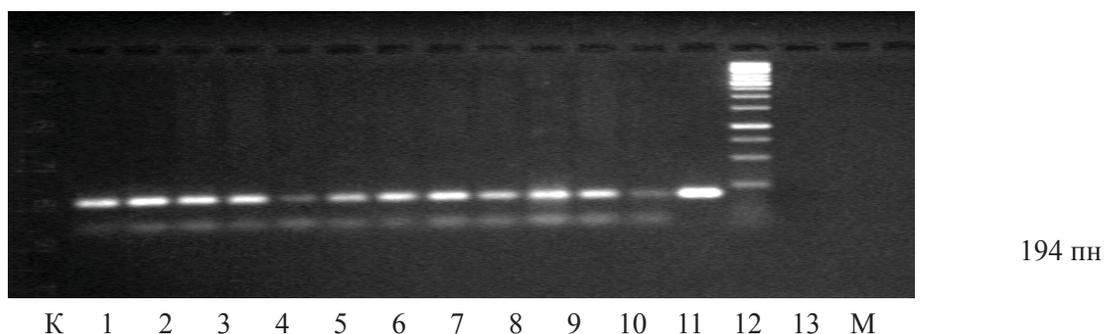


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами к 35S промотору (1 – 12 ДНК индивидуальных растений-регенерантов льна-долгунца сорта Старт, 13 – положительный контроль (ДНК плазмиды pBITUBA8), К – отрицательный контроль ПЦР, М – маркер молекулярной массы 1000 пн).

Все побеги были перенесены на среду для ризогенеза (MS с половинным набором макро- и микросолей), дополненную канамицином (Km_{50}). Культивирование на селективной среде в условиях *in vitro* приводило к заметному угнетению способности к корнеобразованию у части растений. В итоге пять побегов дали корни. Для исключения отбора ложных трансформантов, способных расти на средах с антибиотиком, проведен ПЦР-анализ с праймерами к *nptII* гену, а также к хромосомным генам агробактерии. При агробактериальной трансформации агробакте-

рии способны сохраняться в сосудистой системе и межклеточных пространствах растения в течение нескольких поколений. Для доказательства того, что амплификация последовательности селективного маркера происходит с геномной ДНК генетически модифицированных растений, а не с экспрессионного вектора, который встроен в плазмиду бактериальной клетки, нами проведен анализ с использованием праймеров к хромосомным генам агробактерий. В результате трансгенный статус достоверно подтвержден у пяти растений (рис. 4).

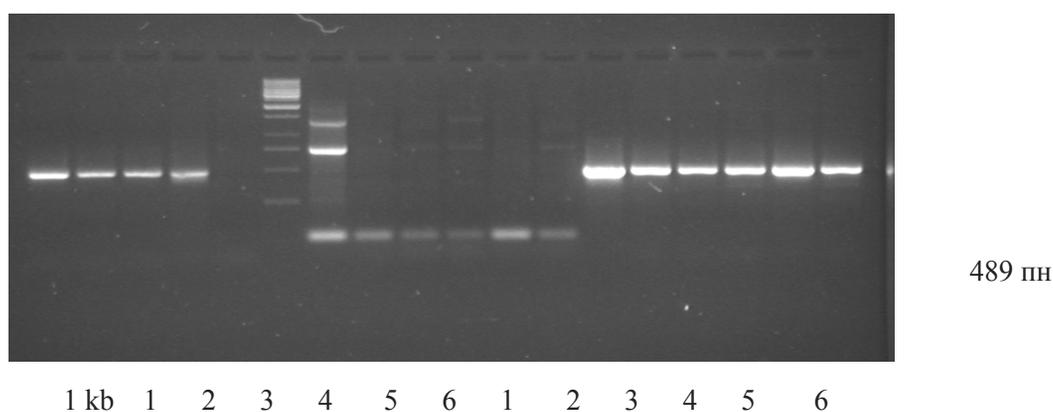


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами к хромосомным генам *A. tumefaciens* и к гену *nptII* (1 – ДНК плазмиды pBITUBA8, 2–6 – ДНК индивидуальных растений льна-долгунца).

Таким образом, комплексный молекулярно-генетический скрининг методом ПЦР первичных трансформантов льна-долгунца сорта Старт, полученных методом агробактериальной трансформации, позволил подтвердить

трансгенный статус пяти истинных трансформантов льна-долгунца.

Работа была выполнена при поддержке БРФФИ (грант Б09К-053).

Список использованной литературы

1. Flax / A. Pretova [et al.] // *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. – 2007. – Vol. 6. – P. 129–140.
2. Mitotic disrupter herbicide: recent advances and opportunities / W.T. Molin [et al.] // *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*. – 1997. – P. 143–158.
3. Vaughn, K. C. Anticytoskeletal herbicides / K. C. Vaughn // *Plant Microtubules: Potential for Biotechnology*. – 2000. – P. 193–205.
4. Vaughn, K.C. The abnormal cell plates formed after microtubule disrupter herbicide treatment are enriched in callose / K.C. Vaughn // *Pest. Biochem. Physiol.* – 2006. – V. 84. – P. 63–71.
5. Устойчивость растений к гербицидам с антимицротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов / А.И. Емец [и др.] // *Физиол. раст.* 1999. 46, – № 6. – С. 899–907.
6. The biochemistry of compounds with antimicrotubule activity in plant cells / L.C. Morejohn [et al.] // *Pharm. Ther.* – 1991. – V. 51. – P. 217–230.
7. Structural and functional organization of tubulin / D.E. Fosket [et al.] // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1992. – V. 43. – P. 201–240.
8. Drugs with colchicine-like effects that specifically disassemble plant but not animal microtubules / A.S. Bajer [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1986. – V. 466. – P. 767–784.
9. Structural modelling of plant α -tubulin interaction with dinitroanilines and phosphoramidates / Ya.B. Blume [et al.] // *Cell Biol. Int.* – 2003. – V. 27. – P. 171–174.
10. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin / R. Anthony [et al.] // *Nature*. – 1998. – V. 393. – P. 260–263.
11. α -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* / E. Yamamoto [et al.] // *Plant Cell*. – 1998. – V. 10. – P. 297–308.
12. Distinct tubulin genes are differentially expressed during barley grain development / V.V. Radchuk [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2007. – V. 131. – P. 571–580.
13. Агробактериальная трансформация льна-долгунца мутантным геном тубулина, несущим устойчивость к динитроанилиновым гербицидам / А.И. Емец [и др.] // *Генетика*. – Т. 45, № 10. – С. 1377–1385.
14. Transfer of amiprophosmethyl-resistance from a *Nicotiana plumbaginifolia* mutant by somatic hybridization / A.I. Yemets [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – V. 100. – P. 847–857.
15. Efficient callus formation and plant regeneration from dinitroaniline-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* (L.) / A.I. Yemets [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2003. – V. 21. – P. 503–510.
16. Sambrook, J. *Molecular cloning: A laboratory manual* / J. Sambrook, D.W. Russell. – Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, NY, 2001. – 999 p.
17. Введение в культуру *in vitro* и регенерационная способность сортов льна-долгунца с различной устойчивостью к полеганию / О.А. Баер [и др.] // *Физиол. биохим. культ. растений*. – 2004. – Т. 36, – № 1. – С. 48–54.
18. Гузенко, Е.В. Трансформация различных генотипов льна-долгунца с помощью *Agrobacterium tumefaciens*: предварительные результаты / Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш, А.И. Емец, Я.Б. Блюм, Н.А. Картель // Факторы экспериментальной эволюции организмов: материалы IV междунар. науч. конф., Алушта, 22–26 сентября 2008 г./, К.: Логос; редкол.: И.П. Барияк [и др.]. – Алушта, – 2008. – С. 268–273.
19. Ризогенез в культуре *in vitro* у сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) / Е.В. Гузенко [и др.] // *Докл. Нац. Акад. наук Беларуси. Сер. Биол. Наук.* – 2009. – Т. 53, № 6. – С. 86–89.
20. Спосіб укорінення рослин, отриманих в культурі *in vitro*: пат. 48060 Україна, МПК51 А 01 Н 4/00/ О.А. Баер, А.И. Емец, Я.Б. Блюм, Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш, Л.В. Хотылева, Н.А. Картель; заявитель Ин-т пищ. биотехн. и геномики НАН Украины – №u2009 07669; заявл. 21.07. 09; опубл. 10.0 .10 // *Офиц. бюл. / Нац. Центр Интел. Собственности.* – 2010. – № 5. – С. 3.
21. Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium*-mediated gene transfer / M. Jordan [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1988. – Vol. 7. – P. 281–284.
22. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. Regeneration of transformed shoots via

callus phase / N. Basiran [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1987. – Vol. 6. – P. 396–399.

23. High efficiency *Agrobacterium*–mediated gene transfer to flax / L. Mlynarova [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1994. – Vol. 13. – P. 282–283.

24. Гузенко, Е.В. Оценка регенерационной способности новых сортов и сортообразцов льна–долгунца (*L. usitatissimum* L.) для последующей агробактериальной трансформации / Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш, Л.В. Хотылева // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: материалы III Междунар. науч. конф., посвящен. 50–летию Отдела биох. и биотехн. раст., Минск, 14–16 мая 2008 г./ центр. бот. сад НАН Беларуси; редкол.: В.Н. Решетников [и др.]. – Минск, – 2008. – Ч. 1. – С. 71–76.

25. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review / S. Millam [et al.] // *Plant Cell Tissue Org. Cult.* – 2005. – V. 82. – P. 93–103.

26. The use of the phosphomannose isomerase gene as alternative selectable marker for *Agrobacterium*–mediated transformation of flax (*Linum usitatissimum*) / F. Lamblin [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2007. – V. 26. – P. 765–772.

27. Гузенко, Е.В. Получение трансгенных растений льна–долгунца, несущих химерный ген GFP–TUA6 / Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш, Г.Я. Баер, О.А. Баер, А.И. Емец, Я.Б. Блюм, Н.А. Картель. // Генетика и биотехнология

XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: материалы междунар. науч. конф., Минск, 3–6 декабря 2008 г./ Минск. гос. ун–т; редкол.: Н.П. Максимова [и др.]. – Минск, – 2008. – С. 62–64.

28. Создание генетически модифицированных растений льна (*Linum usitatissimum* L.) методом биолиственной трансформации / В.А. Лемеш [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биял. навук. – 2010. – № 1. – С. 18–23.

29. Pinosesinol–lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds / C. Hano [et al.] // *Planta.* – 2006. – V. 224. – P. 1291–1301.

30. Трансформация растений льна–долгунца / А.В. Поляков [и др.] // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, – № 6. – С. 882–887.

31. Plant mutants and somatic hybrids with resistance to trifluralin / A.I. Yemets [et al.] // *Cell BioI. Int.* – 1997. – V. 21. – P. 912–914.

32. Transgenic flax plants from *Agrobacterium tumefaciens* transformation – incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants / J.Z. Dong [et al.] // *Plant Sci.* – 1993. – V. 91. – P. 139–148.

33. An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens* / J.Z. Dong [et al.] // *Plant Sci.* – 1993. – V. 88. – P. 61–71.

Дата поступления статьи 21 февраля 2011 г.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ ВЕКТОРНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ С ГЕНОМ *GOX PENICILLIUM FUNICULOSUM*

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

Введение

Наряду с методами традиционной селекции, используемыми для получения высокопродуктивных сортов растений, все большее распространение получают генно-инженерные подходы. Их основным преимуществом являются возможности создания растений, обладающих принципиально новыми признаками, которых невозможно добиться с использованием селекционных методов. Так, в работах G. Wu с соавторами (Monsanto Company) было показано, что трансгенные растения картофеля, экспрессирующие глюкозооксидазу, ген *gox*, обладают повышенной устойчивостью к мокрой бактериальной гнили, вызываемой *Erwinia carotovora ssp. Carotovora*, вертициллезному увяданию, вызываемому *Verticillium dahliae* и фитофторозу, вызываемому *Phytophthora infestans* [1, 2]. Другими авторами были получены трансгенные линии риса и капусты с геном глюкозооксидазы, которые обладали повышенной устойчивостью к некоторым бактериальным и грибным патогенам [3, 4]. Сообщается, что экспрессия глюкозооксидазы может приводить к запуску защитных механизмов растений, таких как образование активных форм кислорода [5, 6], активация защитных генов, локальная клеточная гибель [7] и гиперчувствительный ответ [8, 9], и таким образом, повышать защитные свойства растений.

Известно, что в результате гиперчувствительного ответа происходит быстрая запрограммированная гибель клеток в области внедрения патогена, продукция супероксид-аниона и пероксида водорода, образование сшивок между полимерами клеточной стенки, а также синтез вторичных метаболитов и белков с антимикробной активностью [8, 10]. Данные события блокируют распространение

авирулентного патогена. Следует отметить, что клеточная гибель наступает не вследствие токсического действия активных форм кислорода, а как результат запуска сигнальных каскадов [11].

Гиперчувствительный ответ часто сопровождается развитием приобретенной устойчивости, специфического состояния растения, во время которого оно характеризуется значительным повышением устойчивости к широкому ряду неродственных патогенов [12, 13].

Образование и аккумуляция в большом количестве пероксида водорода приводит к ряду физиологических эффектов: клеточной гибели при гиперчувствительном ответе; формированию системной приобретенной устойчивости; закрытию устьичных щелей; образованию окислительных сшивок между белками и другими полимерами растительных клеточных стенок, а также их лигнификации, в результате чего, повышаются их барьерные свойства [11, 14]. В то время как для активных форм кислорода в целом, показано ингибирующее действие на процесс клеточного деления, в случае пероксида водорода – выявлено его стимулирующее влияние на соматический эмбриогенез [15].

Пероксид водорода характеризуется и прямым антимикробным эффектом. Множество мицелиальных грибов, в первую очередь *Aspergillus* и *Penicillium*, секретируют в окружающую среду глюкозооксидазу, ингибирующую развитие других организмов [16]. Возможно также участие пероксида водорода и в непосредственном ингибировании ферментных систем патогенов, участвующих в деградации растительных клеточных стенок [1].

Таким образом, можно предположить, что

экспрессия гена глюкозооксидазы будет положительно влиять на процессы развития защитно-приспособительных реакций растений, способствующих развитию их устойчивости к разнообразным стрессовым факторам внешней среды, в том числе и к патогенным организмам.

С целью изучения влияния экспрессии гена глюкозооксидазы на образование и аккумуля-

цию пероксида водорода и усиления защитных реакций растений были созданы векторные конструкции с геном глюкозооксидазы *Penicillium funiculosum* и осуществлена агробактериальная трансформация растений. Среди полученных линий растений были отобраны растения, экспрессирующие данный ген, что было доказано методом ПЦР и проверкой активности фермента глюкозооксидазы.

Материалы и методы

Фермент глюкозооксидаза. Глюкозооксидаза (β -D-глюкозо: O_2 -1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4) катализирует реакцию окисления

β -D-глюкозы до β -D-глюконо- δ -лактона и сопряженное восстановление молекулярного кислорода до пероксида водорода (рис. 1).

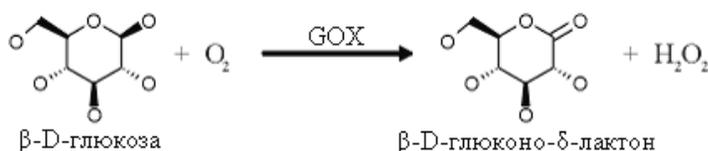


Рис. 1. Реакция окисления β -D-глюкозы.

Образующийся β -D-глюконо- δ -лактон после этого подвергается спонтанному гидролизу до β -D-глюконата (рис. 2).

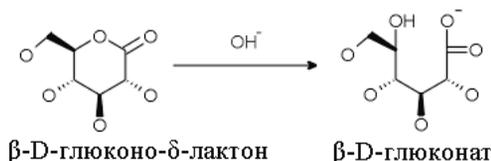


Рис. 2. Гидролиз β -D-глюконо- δ -лактона

Молекулярная масса глюкозооксидазы *P. funiculosum* составляет 140 ± 10 кДа, молекулярная масса каждой субъединицы – порядка 70 кДа. Фермент обладает высокой субстратной специфичностью к β -D-глюкозе ($K_m = 3,3$ мМ; при значении pH 7,0; $25^\circ C$). Фермент характеризуется большей pH- и температурной стабильностью, по сравнению с глюкозооксидазой штаммов рода *Aspergillus*, что, по-видимому, указывает на различия в структуре активных центров этих ферментов [17].

В качестве источника гена глюкозооксидазы (*gox*), в данной работе использовали штамм 46.1 *P. funiculosum*. Глюкозооксидаза этого штамма отличается высокой каталитической активностью при значении pH выше 6.0.

Кроме β -D-глюкозы, данный фермент окисляет также 2-деокси-D-глюкозу, мальтозу и галактозу [18, 19].

Трансформация агробактерий. Для проведения экспериментов по агробактериальной трансформации табака и картофеля использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Агробактерии трансформировались методом замораживания-оттаивания [20]. Клетки бактерий культивировали на стандартной агаризованной среде LB при температуре $28^\circ C$. В среду добавляли антибиотики рифампицин (50 мг/л) для избирательного роста агробактерий и канамицин (50 мг/л) как селективный маркер. Отбор клонов проводился методом ПЦР. Полученные агробактериальные штаммы с не-

обходимыми плазмидами использовались для трансформации растений табака и картофеля.

Трансформация растений картофеля. Для трансформации картофеля был выбран сорт Скарб. Молодые листья разрезали на несколько частей, на которых делали надсечки. Листовые диски выдерживали в суспензии агробактерий в течение 15-30 мин. Затем листовые диски отмывали в чашках Петри со стерильной H_2O и помещали на чашку с агаризованной MS-LD (соли MS, витамины по Морелю [21], сахара 30 г/л, цитокинины: 2,5 мг/л БАП (6-бензиламинопурин), 1 мг/л зеатин, ауксины: 0,1 мг/л НУК (нафтилуксусная кислота), агар 7 г/л pH 5,8) в количестве 15-20 дисков на чашку. Чашки инкубировали в темноте при температуре 24°C до появления светлого агробактериального ореола. Затем экспланты переносили на среду MSR2 (соли MS, витамины по Морелю [21], сахара 30 г/л, 1 мг/л БАП (6-бензиламинопурин), 2 мг/л зеатин, 0,1 мг/л НУК (нафтилуксусная кислота), 0,5 мг/л кинетин, 0,1 мг/л гибберелиновая кислота, агар 7 г/л pH 5,8) с добавлением антибиотика тиментина (тикарциллин+клавулановая кислота) в концентрации 200 мг/л и селективного агента (канамицина в концентрации 50 мг/л). Через 5 дней пересаживали экспланты на свежую среду с антибиотиками того же состава. Далее экспланты пересаживали, удаляя некрозы, с интервалом 10-20 дней.

Для повышения эффективности каллусогенеза использовали контрастную стимуляцию: помещали чашки с эксплантами в темноту на 2

суток при температуре 24-25°C, переносили на неделю на свет (5000 Лк) на 25°C с фотопериодом 16/8 часов, далее помещали чашки с эксплантами в холодильник (+4°C) на 12 часов, снова переносили на неделю на свет (5000 Лк) на 25°C с фотопериодом 16/8 часов. Регенеранты срезали по достижении ими длины 1 см и высаживали на среду MS для черенкования с добавлением 200 мг/л тиментина, 1 мг/л НУК, 1 мг/л гибберелиновой кислоты и антибиотика канамицина. После 2-3 пассажей переносили на стандартную среду MS.

Трансформация растений табака. Для трансформации табака использовали линию *N. tabacum* cv. *Petit Havana SR*. Молодые листья табака нарезали на небольшие фрагменты и помещали в чашку с разбавленной суспензией агробактерий. Чашки заворачивали в парафильм и 2-3 суток выдерживали в темноте при 22°C. Затем экспланты извлекали из жидкой среды и помещали на агаризованную среду SIM (соли и витамины MS, 30 г/л сахарозы, 0,2 мг/л БАП, 1 мг/л НУК, pH 5,8) с добавлением 50 мг/л канамицина и 200 мг/л тиментина. Через 2 недели проводили пересадку на агаризованную среду SIM (соли и витамины MS, 30 г/л сахарозы, 8 г/л агара, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК, 50 мг/л канамицина, 200 мг/л тиментина, pH 5,8). Регенеранты отсаживали на агаризованную среду RIM (соли и витамины MS, 30 г/л сахарозы, 8 г/л агара, 0,05 мг/л ИУК, 50 мг/л канамицина, 200 мг/л тиментина, pH 5,8). После 2-3 пассажей регенеранты переносили на стандартную среду MS.

Результаты и обсуждение

Создание векторных конструкций с геном глюкозооксидазы. Ген *gox* был выделен из грибного штамма 46.1 *P. funiculosum* и клонирован в плазмиду pUC18 по сайтам NdeI и EcoRI. Полученная плазида была обработана ферментами NdeI и затем Pfu ДНК-полимеразой для образования тупых концов. Затем плазида была рестрицирована по сайту EcoRI. Плазида pGem5Zf(+), несущая по сайту PstI вставку гена лихеназы с лидерной последовательностью экстенсина моркови под контролем CaMV 35S промотора, была обработана рестриктазами HindIII и EcoRI. Сайт узнавания рестриктазы HindIII был затуплен

Pfu ДНК-полимеразой. В полученный вектор клонирован фрагмент, содержащий ген *gox*. В результате получена плазида, которая несет в одной рамке считывания лидерную последовательность секретиции в апопласт и ген глюкозооксидазы *P. funiculosum*. Это позволяет белку секретироваться в апопласт и, таким образом, защищает клетку от возможных неблагоприятных эффектов, связанных с внутриклеточной экспрессией глюкозооксидазы.

В дальнейшем полученная кассета, состоящая из лидерного пептида и гена глюкозооксидазы, была переклонирована в плазмиду pND706 по сайтам SalI и EcoRI. Из этой плаз-

миды вставка была вырезана рестриктазой *Sma*I и клонирована в плазмиду pBI121 по сайтам *Sma*I и *Ecl*136II. Полученный вектор назван pBI-L-GOX (рис. 3).

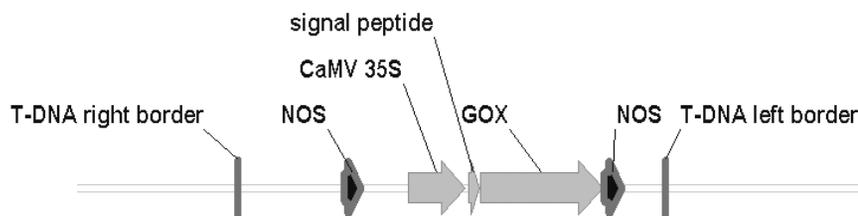


Рис. 3. Схема растительного вектора pBI121 с геном глюкозооксидазы, pBI-L-GOX.

Так же был создан вектор с промотором *CaMV* 35S, энхансером омега и геном *gox*. Это должно привести к увеличению уровня транскрипции гена, и таким образом, увеличить количество фермента глюкозооксидазы. Из плазмиды pCd промотор *CaMV* 35S с энхансером омега был вырезан по сайтам *Sma*I и *Eco*RI и клонирован в плазмиду pBluescrip-

tII KS (+) по сайтам *Eco*RV и *Eco*RI. Затем фрагмент полученной плазмиды, содержащий промотор, был переклонирован в плазмиду pBilin по сайтам *Hind*III и *Sma*I. По сайту *Stu*I клонирована кассета *nos-npt*II. В полученный вектор клонирован ген *gox* по сайтам *Sma*I и *Ecl*136II. Полученный вектор назван pBI-F-GOX (рис. 4).

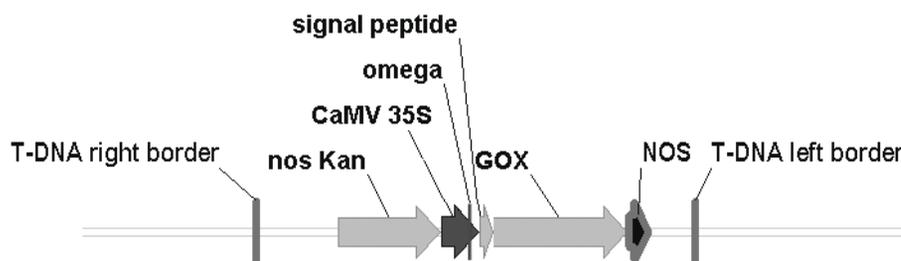


Рис. 4. Схема растительного вектора pBI121 с геном глюкозооксидазы, pBI-F-GOX.

Полученные векторы были использованы для проведения агробактериальной трансформации растений табака и картофеля.

Трансформация растений. В ходе проведения агробактериальной трансформации растений картофеля сорта Скарб, было получено, 120 регенерантов с векторной конструкцией pBI-L-GOX и 80 регенерантов с векторной конструкцией pBI-F-GOX, укоренившихся на среде с канамицином. В эксперименте по трансформации табака было отобрано по 10 регенерантов с каждым растительным вектором. Первичные трансформанты, проявившие способность образовывать корневую систему в присутствии канамицина, были отобраны для дальнейших исследований. Из данных растений была выделена ДНК для проведения ПЦР.

Молекулярный анализ полученных растений. С целью обнаружения вставки целевого фрагмента, гена глюкозооксидазы, была использована следующая пара праймеров: 5'-TGAAATTGGCGAAGAAGACGGC -3' и 5'-TGGAATTGGGACAACATGTTTCGAGT -3', генерирующих фрагмент длиной 673 п.н.. Реакцию ПЦР проводили в буфере для Taq-полимеразы, с добавлением 0.02 мМоль каждого из dNTP, 0.2 мкМоль каждого из праймеров, 150-200 нг ДНК картофеля либо табака и 1-2U Taq-полимеразы. Амплификация проводилась по следующей программе: 94°C – 5 мин, 30 циклов [94°C – 30 сек, 54°C – 30 сек, 72°C – 45 сек], 72°C – 7 минут. Продукты амплификации разделялись в 1,5% агарозном геле (рис. 5).

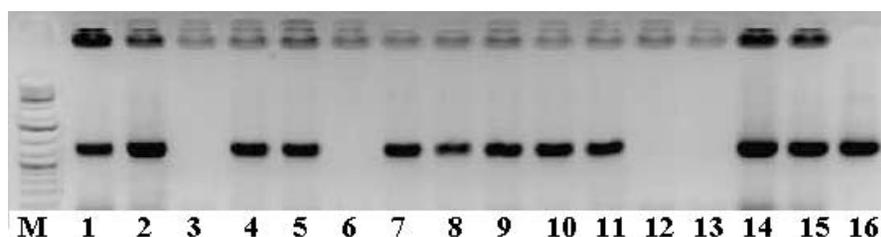


Рис. 5. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК растений картофеля, отобранных на канамицине. М – маркер молекулярного веса, 1-15 – образцы растений, проявляющих устойчивость к канамицину, 16 – положительный контроль, плаزمида с геном глюкозооксидазы. Присутствие продукта амплификации свидетельствует о наличии встроеного гена *gox* в геном растения.

Так же были подобраны пары праймеров для определения наличия последовательности пост-терминатора, фрагмент 180 п.н. и контрольного резидентного гена актина, фрагмент 550 п.н.,

который экспрессируется во всех растениях картофеля, и может быть использован как положительный контроль для проверки качества выделенной ДНК и проведения ПЦР (рис. 6).

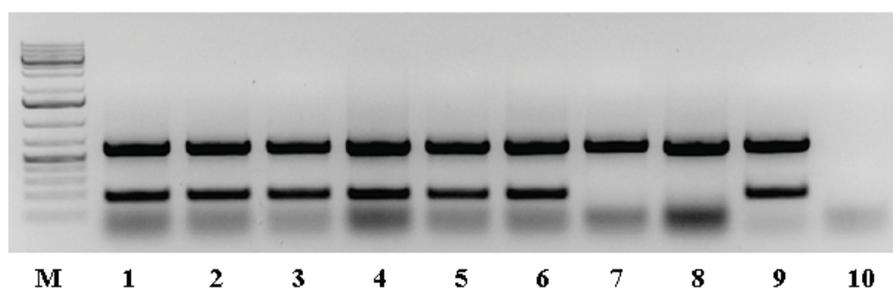


Рис. 6. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК трансгенных и контрольных растений картофеля. М – маркер молекулярного веса, 1-6 – образцы трансгенных растений, 7-8 – образцы нетрансформированных растений картофеля, 9 – положительный контроль, 10 – отрицательный контроль. Верхний фрагмент, 550 п.н. – ген актин. Нижний фрагмент, 180 п.н. – пост-терминатор.

Присутствие рекомбинантных агробактериальных штаммов, потенциально являющихся источником ложно-положительных результатов при ПЦР-анализе трансформантов, проверяли методом ПЦР с праймерами 5'-CGAATACATTCTCGTGCGTCAAACG-3' и 5'-TTTCGAGTCATGCATAATGCCTGAC-3', специфичными к агробактериальному гену *VirE2*, по следующей программе: 95°C – 5 мин, 30 циклов [94°C – 30 сек, 60°C – 30 сек, 72°C – 42 сек], 72°C – 7 мин. Продукты амплификации разделялись в 1,5% агарозном геле. Отсутствие ПЦР-продукта свидетельствует об отсутствии агробактерий в проводящих путях растений и, соответственно, подтверждают достоверность результатов, свидетельствующих о наличии целевых генов в геномном составе

отобранных первичных трансформантов табака и картофеля.

Таким образом, в результате молекулярно-генетического анализа, были отобраны растения, которые несут в своем геноме вставку гена *gox*.

Проверка активности фермента глюкозооксидазы чашечным тестом. Для доказательства того, что в растениях табака и картофеля эффективно синтезируется рекомбинантный белок, был проведен следующий эксперимент: листья, части корней и стеблей предположительно трансгенных растений помещали на 1%-ный агарозный гель, содержащий 50 мМ йодида калия, 5% крахмала, 200 мМ D-глюкозы. В результате чего, глюкозооксидаза окисляла глюкозу и

образовывался пероксид водорода. Образование пероксида водорода регистрировали по развитию синей окраски вокруг расти-

тельных тканей [15]. Вокруг контрольных растений окрашивания не происходило (рис. 7).

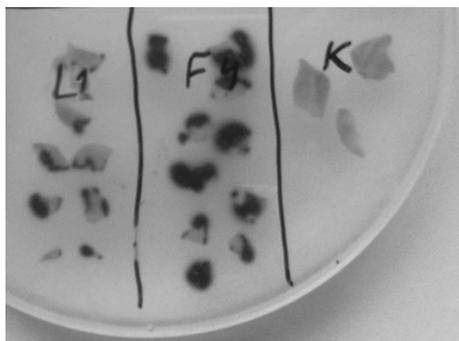


Рис. 7. Определение активности гена глюкозооксидазы. L и F – линии трансгенных растений, K – контрольные растения.

Полученные результаты в ходе проведения ПЦР и чашечного теста свидетельствуют о наличии и экспрессии гена глюкозооксидазы в полученных трансгенных растениях.

В результате проведенных экспериментов было отобрано 53 растения картофеля, трансформированных вектором pBI-L-GOX и 24 растения картофеля, трансформированных вектором pBI-F-GOX, что составляет 44% и 30% среди отобранных на канамицине растений. Среди рас-

тений табака было отобрано по 3 регенеранта с каждой векторной конструкцией.

Все растения, которые давали окрашивание при проведении чашечного теста, являлись положительными при проведении амплификации с праймерами к гену *gox*, что может свидетельствовать о высокой эффективности данного подхода при отборе трансформантов и исключить растения, в которых имеется вставка целевого гена, но экспрессия не происходит.

Заключение

Таким образом, в результате выполненной работы были созданы векторы для трансформации растений с геном глюкозооксидазы *gox P. funiculosum*. В результате агробактериальной трансформации табака и картофеля генетическими конструкциями получены линии трансгенных растений, в которых при помощи ПЦР обнаруживается вставка данного гена.

Активность глюкозооксидазы выявлена в растениях по способности генерировать большое количество перекиси водорода в присутствии глюкозы. Можно ожидать, что экспрессия глюкозооксидазы приведет к повышению устойчивости растений к неблагоприятным факторам и широкому ряду патогенов, что будет проверено последующими экспериментами.

Список использованных источников

1. Disease Resistance Conferred by Expression of a Gene Encoding H_2O_2 -Generating Glucose Oxidase in Transgenic Potato Plants / Gusui Wu [et al.] // *The Plant Cell*. – 1995. – Vol. 7. – P. 1357–1368.
2. Activation of Host Defense Mechanisms by Elevated Production of H_2O_2 in Transgenic Plants / Gusui Wu [et al.] // *Plant Physiology*. –

1997. – Vol. 115. – P. 427–435.

3. Induction of H_2O_2 in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens / A. Kachroo [et al.] // *Transgenic Research*. – 2003. – Vol. 12. – P. 577–586.

4. Enhanced disease resistance in transgenic cabbage and tobacco expressing a glucose

- oxidase gene from *Aspergillus niger* / Y.H. Lee [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2002. – Vol. 20. – P. 857–863.
5. Elicitor- and wound- induced oxidative cross-linking of a praline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response / D.J. Bradley [et al.] // *Cell.* – 1992. – Vol. 70. – P. 21–30.
6. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defenses in plants / R.A. Dixon [et al.] // *Adv. Genet.* – 1990. – Vol. 28. – P. 165–234.
7. Keen, N.T. The molecular biology of disease resistance / N.T. Keen // *Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 19. – P. 109–122.
8. Greenberg, J.T. Programmed cell death in plant-pathogen interactions / J.T. Greenberg // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 48. – P. 25–45.
9. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions / J.T. Greenberg [et al.] // *Cellular Microbiology.* – 2004. – Vol. 6. – P. 201–211.
10. Resistance gene-dependent plant defense responses / K.E. Hammond-Kosack [et al.] // *Plant Cell.* – 1996. – Vol. 8. – P. 1773–1791.
11. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco / S. Chamnongpol [et al.] // *Plant Biology.* – 1998. – Vol. 95. – P. 5818–5823.
12. Gozzo, F. Systemic acquired resistance in crop protection / F. Gozzo // *Outlooks on Pest Management.* – 2004. – P. 20–23.
13. Attitalla, I. H. Biological and molecular characteristics of microorganism-stimulated defence response in *Lycopersicon esculentum* – L / I. H. Attitalla // *Acta Universitatis Upsaliensis.* – 2004. – P. 1–82.
14. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers / T. S. Potikha [et al.]. // *Plant Physiology.* – 1999. – Vol. 119. – P. 849–858.
15. Signal transduction during oxidative stress / E. Vranova [et al.] // *J. of Exp. Botany.* – 2002. – Vol. 53. – P. 1227–1236.
16. Isolation of the glucose oxidase gene from *Talaromyces flavus* and characterisation of its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae* / F.R. Murray [et al.] // *Current Genetic.* – 1997. – Vol. 32. – P. 367–375.
17. Стабильность и каталитические свойства глюкозооксидазы из *Penicillium funiculosum* G-15 / Давыдова М. Е. [и др.] // *Вестник Московского Университета.* – 2002. – Т. 43. – С. 366–370.
18. Внеклеточная глюкозооксидаза *Penicillium funiculosum* 46.1 / Семашко Т. В. [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2003. – Т. 39. – С. 419–426.
19. Glucose oxidase from *Aspergillus niger* / K. R. Frederic [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1990. – Vol. 265. – P. 3793–3802.
20. Transfection and transformation of *A. tumefaciens* / M. Holsters [et al.] // *MGG.* – 1978. – Vol. 163. – P. 181–187.
21. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige [et al.] // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

Дата поступления статьи 23 февраля 2011 г.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА *VAI* СРЕДИ СОРТОВ И ОБРАЗЦОВ ЯБЛОНИ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ВЫРАЩИВАЕМЫХ В БЕЛАРУСИ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, Академическая, 27

²РУП «Институт плодородства» Республика Беларусь, 223013, Минская обл.

Минский р-н, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

Введение

В условиях Республики Беларусь одним из самых вредоносных и широко распространенных заболеваний яблони является парша, которая поражает листья, плоды, цветки, молодые побеги и почечные чешуйки. Возбудителем заболевания является гриб *Venturia inaequalis* (Coock.) Wint. (конидиальная стадия *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fuck.). У восприимчивых сортов в годы эпифитотийного развития заболевания снижение выхода первосортной продукции может достигать 90% [1]. Выделение высокоустойчивых и устойчивых сортов и их внедрение в промышленное садоводство является безопасным методом защиты яблони и эффективным способом получения продукции с улучшенными экологическими характеристиками, что, впоследствии, будет способствовать уменьшению техногенной нагрузки на садовый биоценоз.

В настоящее время известно не менее 15 генов, обеспечивающих устойчивость яблони к парше [2]. Традиционно используемые названия этих генов были даны авторами, впервые описавшими конкретный ген. В. Бас с соавторами предложили новую номенклатуру генов устойчивости к парше, соответствующую современным международным требованиям [2, 3]. Пока в литературе наряду с новым названием, в скобках приводится и традиционное название гена [2]. В данной статье мы будем придерживаться этого правила.

Известные гены устойчивости к парше различаются по происхождению. Источники генов были обнаружены как среди культурных сортов, так и у диких видов

яблони. Так, сеянец яблони, известный под названием Russian seedling R12740-7A, является источником двух генов *Rvi2* (*Vh2*) и *Rvi4* (*Vh4*) [4]. Ген *Rvi5* (*Vm*) присутствует у клонов диких видов *M. ×micromalus* 245-38 и *M. ×atrosanguinea* 804 [5]. Получивший самое большое распространение в современных сортах яблони ген *Rvi6* (*Vf*) впервые был обнаружен у дикого вида яблони с мелкими плодами *M. ×floribunda* 821 [6]. В геноме *M. ×floribunda* 821 позже был обнаружен второй ген *Rvi7* (*Vfh*) [7]. Ген *Rvi8* (*Vh8*) был идентифицирован в геноме *M. ×sieversii* W193B [8]. Гены *Rvi11* (*Vbj*) и *Rvi12* (*Vb*) найдены у *M. baccata jackii* и Hansen's *baccata* #2 [9]. Источником гена *Rvi15* (*Vr2*) является образец дикой яблони GMAL 2473 *Rvi15* (*Vr2*) [10]. Интродукция генов устойчивости к парше из диких видов в культурные сорта может быть достаточно эффективной, как показывает практическое использование гена *Rvi6* (*Vf*). Как правило, этому предшествует длительный селекционный процесс, необходимый для того, чтобы избавиться от нежелательного влияния, которые дикие виды яблони оказывают на качество плодов.

Среди культурных сортов известными источниками генов устойчивости к парше являются Golden Delicious (ген *Rvi1* (*Vg*)), старый итальянский сорт Durello di Forli (*Rvi13* (*Vd*)), немецкий сорт Dölmener Rosenapfel (ген *Rvi14*) [11-13]. Ценным и высокоэффективным источником устойчивости к парше признан старый русский сорт Антоновка обыкновенная, происхождение которого неизвестно. Считается, что этот сорт

обладает как полигенной, так и моногенной устойчивостью [14]. В геноме разных образцов Антоновки выявлены гены *Rvi10(Va)*, *Rvi17(Va1)* и *Va2* [15, 16]. Природа полигенной устойчивости окончательно не выяснена. Однако бесспорно, что сорт демонстрирует высокую устойчивость к парше, и что особенно важно, в полевых условиях, на протяжении длительного времени возделывания. Благодаря этим качествам он широко используется как источник устойчивости к парше во многих селекционных программах [17, 18]. Ряд современных сортов, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь, являются потомками Антоновки обыкновенной.

Кроме этого сорта, высокой устойчивостью к парше в полевых условиях характе-

ризуются также многие сорта белорусской селекции, целенаправленная работа по созданию которых была начата в 20-х годах XX ст. В частности, сорта яблони, созданные А.Е. Сюзаровым с использованием высоко устойчивых к парше исходных форм, сохраняют свою актуальность в селекции и сегодня [19]. К сожалению, пока не удалось выявить генетический механизм, обуславливающий высокую полевую устойчивость этих сортов к заболеванию.

Данное исследование было проведено с целью выявления источников одного из генов, который несет Антоновка обыкновенная, гена *Rvi17(Va1)*, среди сортов яблони различного генетического происхождения, а также отбора гибридных сеянцев яблони с данным геном для дальнейшей селекционной работы.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектом изучения служили 128 сортов и видов яблони, произрастающих в саду РУП «Институт плодородия». Сформированная выборка была представлена сортами различного генетического происхождения селекции Беларуси, России, Украины, Германии, США и других стран. В исследование были включены как современные сорта, так и старые сорта, традиционно выращиваемые в Беларуси. Для каждого сорта уточнялась родословная. Анализу подвергались также гибридные сеянцы яблони, полученные от различных комбинаций скрещивания в РУП «Институт плодородия».

Выделение ДНК. Препараты ДНК были получены из фрагмента листа отдельного растения. Выделение ДНК проводили с помощью Genomic DNA Purification Kit фирмы Fermentas согласно рекомендованному протоколу.

Условия амплификации. Для идентификации генов *Rvi6(Vf)* и *Rvi17(Va1)* применяли молекулярные маркеры, выявляемые в ре-

зультате ПЦР. Название, последовательность и температура отжига праймеров представлена в таблице 1. Праймеры синтезированы компанией Праймтех (Беларусь).

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 40 нг ДНК, 75 мМ трис-НСl (рН 8.8 при 25°C), 20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween 20, 0,2 мМ dNTP, 200 мМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы. Реакцию проводили в следующем режиме: 94°C – 4 мин; 40 циклов 94°C – 40 сек, $T_{\text{отж}}^{\circ}$ – 1 мин, 72°C – 2 мин; 72°C – 8 мин.

Продукты амплификации с праймерами Vf2ARD обрабатывали рестриктазой *FokI* (Fermentas) в течение 2 часов при 55°C в буфере, рекомендуемом фирмой Fermentas.

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).

Таблица 1

Название, последовательность и температура отжига праймеров, использованных для идентификации генов устойчивости к парше

№	Ген	Название маркера	Последовательность нуклеотидов	T° _{отж}	Литература
1	<i>Rvi6(Vf)</i>	VfC	F GGT TTC CAA AGT CCA ATT CC R CGT TAG CAT TTT GAG TTG AC	58°C	[20]
2	<i>Rvi6(Vf)</i>	AL07 + AM19	F TGG AAG AGA GAT CCA GAA AGT G RCAT CCC TCC ACA AAT GCC F CGT AGA ACG GAA TTT GAC AGT G R GAC AAA GGG CTT AAG TGC TCC	60°C	[21]
3	<i>Rvi17(Val)</i>	Vf2ARD	F TCT TGG ACC TAA GCA ACA ATG AT R AGT TGT CCT GTA AGT TGA TTG GC	57°C	[16]

Результаты и обсуждение

Для идентификации гена *Val* был использован молекулярный маркер Vf2ARD [16]. Маркер ограничивает последовательность *VfARD*, расположенную на расстоянии 3.1 сМ от гена. На основе первичной последовательности этого фрагмента разработан CAPS маркер, позволяющий идентифицировать ген *Rvi17(Val)* [16]. О присутствии гена свидетельствует фрагмент длиной 343 п.н., выявляемый после разрезания продуктов амплификации рестриктазой *FokI*. Маркерный фрагмент был обнаружен у 12 сортов. Результаты представлены в таблице 2.

Сорта белорусской селекции Белорусский синап, Чаравница, содержащие маркерный фрагмент гена *Rvi17(Val)*, являются непосредственными потомками сорта Антоновка обыкновенная. Родителем сорта Пепин литовский улучшенный вероятно также является Антоновка обыкновенная, на что указывают многочисленные морфологические признаки. Сорта Коваленковское, Лошицкое, Память Пашкевича, Коробовка крупноплодная были получены в результате свободного опыления, что затрудняет поиск вероятного родителя и источника гена. Вербное и Новинка осени не являются прямыми потомками Антоновки, но, возможно, что у их исходных форм имелся общий предок с Антоновкой. Сорт Freedom селекции США также имеет в родословной

Антоновку. Он был получен в результате следующей комбинации скрещивания: (Macoun × Antonovka) × (Golden Delicious × F₂ 26829-2-2). Проведенные ранее исследования указывали на то, что Freedom унаследовал ген устойчивости к парше от Антоновки [22]. Предположение было основано на результатах наблюдения в полевых условиях за потомством Freedom. Полученные нами результаты говорят в пользу того, что сорт содержит ген *Rvi17(Val)*.

Под названием Антоновка в разных коллекциях мира, в частности в Geneva apple germplasm repository, встречаются различные генотипы [14]. Генетические отличия между отдельными образцами были подтверждены [23]. Изменчивость Антоновки отмечена отечественными pomологами [24, 25]. В представленном исследовании мы провели тестирование 10 образцов Антоновки, собранных в разных частях Беларуси и имеющих отличия по морфологическим признакам. Результаты представлены на рисунке 1. Они показали, что из 10 образцов 9 содержат маркерный фрагмент, соответствующий гену *Rvi17(Val)*. У образца под номером 19 данный фрагмент не представлен. Очевидно, что этот образец отличается от других на генетическом уровне. Соответствующий гену фрагмент представлен в геноме Антоновки стаканчатой могилевской.

Таблица 2

Результаты тестирования сортов, видов и образцов яблони на присутствие гена *Rvi17(Va1)*

Образцы, содержащие маркерный фрагмент гена <i>Rvi17(Va1)</i>	Образцы, не содержащие маркерный фрагмент гена <i>Rvi17(Va1)</i>
<p>Антоновка обыкновенная, Антоновка стаканчатая могилевская, Белорусский синап, Вербнае, Коваленковское, Коробовка крупноплодная, Лошицкое, Новинка осени, Память Пашкевича, Пепин литовский улучшенный, Freedom, Чаравница.</p>	<p>Алеся, Alkmene, Амулет, Антей, Alamata, Ауксис, Афродита, Бабушкино, Банановое, Белорусское летнее, Белорусское малиновое, Белорусское сладкое, Белый налив, Болотовское, Боровинка, Важак, Веняминовское, Всеялина, Ветеран, Witos, Дарунак, Jonagold, Discovery, Dolgo, Edera, Елена, Geneva, Заря Алатау, Заславское, Имант, Имрус, Кандиль орловский, Kent, Коштеля, Креб ГК-1, Lawfam, Лучезарное, McIntosh, Медуница, Melba, Мечта, Минкар, Минское, Надзейны, Народное, Несравненное, Новое сладкое, Нора, Орловим, Орловское полесье, Осеннее полосатое, Otava, Память Вавилова, Память Исаева, Память Коваленко, Память Сикоры, Память Сябаровой, Папировка, Пепин литовский, Пепинка золотистая, Первинка, Перлына Киева, Пинова, Поспех, Ребристое, Reanda, Rewena, Reka, Relinda, Retina, Sawa, Свежесть, Серуэл, Синап орловский, Скала, Слава победителям, Солнышко, СООР-10, Старт, Стойкое, Строевское, Сябрына, Теллисааре, Тораз, Утро, Wealthy, Fiesta, Flogina, Цыганочка, Черное дерево, Чистотел, Чулановка, Щедрое, Elstar, Empire, Юбиляр, Юпитер, <i>M. × purpurea</i>, F₂, <i>M. coronaria</i>, <i>M. × floribunda</i> K2362, <i>M. ioensis</i>, <i>M. ioensis</i> 2352, <i>M. × prunifolia</i>, <i>M. × sargentii</i> × Ренет Симиренко, 9/22 <i>M. sieboldii</i>, 25/170 <i>M. sieboldii</i> × Спарган, F₂ <i>M. sieboldii</i>, <i>M. sylvestris</i>, <i>M. sonfardii</i> × 2414, <i>M. transitoria</i>, <i>M. × hybrid</i> MA1255, <i>M. × zumi orobs</i>, <i>M. × cerasifera</i>, <i>M. × sargentii</i>, <i>M. × robusta</i>, <i>M. baccata</i>.</p>

У ряда сортов, родословная которых непосредственно связана с сортом Антоновка обыкновенная: Алеся, Антей, Белорусское малиновое, Заславское, Имант, Имрус, Надзейны, Орловим, Память Коваленко, Память Сябаровой, Первинка, Поспех, Свежесть, Чистотел – искомый ген выявлен не был. Тем не менее, для представленных сортов характерна полевая устойчивость к парше, что позволяет рассматривать сорт Антоновка обыкновенная и его потомков как объект для дальнейших более углубленных исследований природы устойчивости.

Сорта, несущие маркерный фрагмент гена *Rvi17(Va1)* характеризуются высокой устойчивостью к парше. Один из этих сортов, Чаравница, был использован в качестве материнского растения при получении гибридных

сеянцев. Сорт Чаравница был получен в результате скрещивания сортов Белорусский синап и Ренет Кокса (Cox's Orange Pippin) в 1963 г. Е.В. Семашко. Он обладает рядом хозяйственно ценных качеств, среди которых устойчивость к парше, мучнистой росе, тле, зимостойкость. К его преимуществам по сравнению с Антоновкой обыкновенной можно отнести более высокое качество плодов и продолжительный срок хранения.

С использованием сорта Чаравница было получено нескольких гибридных семей. Сеянцы, полученные от скрещивания Чаравницы, были подвергнуты анализу на присутствие маркера к гену *Rvi17(Va1)*. Тестирование показало, что маркерный фрагмент унаследовало 62 сеянца из 157, что составляет 39,5% от общего числа образцов (табл. 3).

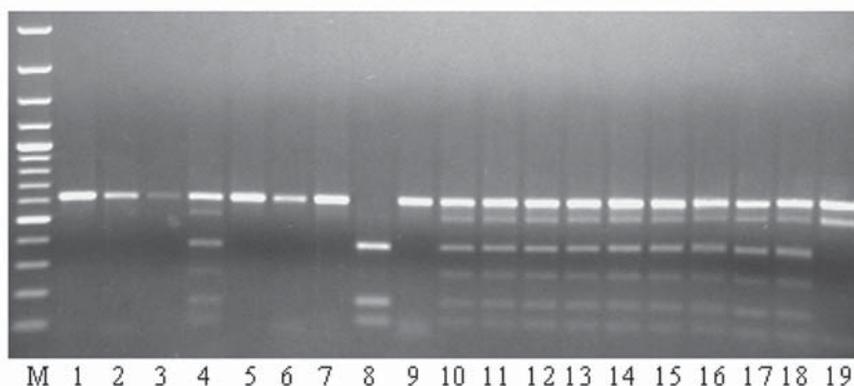


Рис. 1. Результаты разделения методом электрофореза в 1% агарозном геле продуктов амплификации ДНК образцов яблони с маркером Vf2ARD. М - маркер молекулярного веса GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas); 1 - Алеся, 2 - Alkmene, 3 - Антей, 4 - Антоновка стаканчатая могилевская, 5 - Ауксис, 6 - Бабушкино, 7 - Банановое, 8 - Белорусский синап, 9 - Белорусское летнее, 10-19 - образцы Антоновки обыкновенной.

Кроме того, в геноме отдельных гибридных сеянцев представлен высокоэффективный ген устойчивости к парше *Rvi6(Vf)*. Присутствие гена было подтверждено тестированием с помощью молекулярных маркеров VfC и AL07 + AM19. При этом маркер VfC ограничивает фрагмент гомологов генов устойчивости, один из которых соответствует гену *Rvi6(Vf)*, что позволяет с максимальной точностью определять присутствие гена. Маркер AL07 + AM19 является сцепленным. Результаты, полученные с использованием обоих маркеров, полностью совпали. Ген *Rvi6(Vf)* был обнаружен в геноме 34 гибридных сеянцев. Он представлен в образцах из гибридных семей, полученных от комбинации скрещивания Чаравница × Имрус, Чаравница × Сябрына. Источником гена являлись сорт Имрус и сорт белорусской селекции Сябрына, полученных в результате скрещивания Lobo × Prima. Два сеянца с геном *Rvi6(Vf)* были обнаружены в гибридной семье Чаравница св. оп. В данном случае произошло опыление неизвестным источником гена.

Среди гибридных сеянцев выявлено 13, содержащих одновременно ген *Rvi6(Vf)* и *Rvi17(Va1)*, что составляет 8,3% от общего количества сеянцев. Наибольшее количество таких образцов (9) представлено в семье Чаравница × Сябрына.

Полевая оценка анализируемых сеянцев показала, что среди гибридов, содержащих только ген *Rvi17(Va1)*, абсолютное большинство оказалось устойчивыми (поражение паршой

1-2 балла) – 76%. Также среди данной группы 18% растений были отнесены к среднепоражаемым (поражение 3 балла), а 6% не имели признаков поражения. Среди сеянцев, у которых были выявлены оба гена *Rvi17(Va1)* и *Rvi6(Vf)*, 8% генотипов проявили исключительно высокую стабильную полевую устойчивость к заболеванию (поражение отсутствовало), 76% анализируемых растений оказались устойчивыми к парше – поражение не более 1 балла, лишь на 8% сеянцев развитие патогена *V. inaequalis* достигало 2 баллов. Доля среднепоражаемых сеянцев составила только 8%, а восприимчивых к парше генотипов выявлено не было. Данные гибриды представляют собой ценные исходные формы для дальнейшей селекционной работы, особенно с учетом того, что в эпифитотийные годы поражение сортов Имрус и Сябрына, используемые в качестве источников гена *Rvi6(Vf)*, достигало 2 баллов.

Важно, что оба гена являются высокоэффективными. Ген *Rvi6(Vf)* обеспечивает устойчивость к нескольким расам патогена. Считается, что на эффективность этого гена влияют гены-модификаторы, которые содержат разные сорта яблони [26]. В последнее время отмечены случаи преодоления устойчивости, обеспечиваемой геном, 6 и 7 расами патогена. Поэтому особую актуальность приобрел поиск новых источников генов устойчивости к парше. Одним из таких генов может стать *Rvi17(Va1)*. Спектр устойчивости гена

Rvi17(Va1) к различным расам *V. inaequalis* до конца не известен. Однако имеющиеся сведения демонстрируют, что он способен противо-

стоять расам 6 и 7 [16]. Объединение в одном генотипе генов *Rvi6(Vf)* и *Rvi17(Va1)* обеспечивает эффективную защиту яблони от парши.

Таблица 3

Результаты тестирования гибридных семян яблони

Гибридная семья	Количество семян в семье	Количество гибридов, содержащих маркер Vf2ARD (ген <i>Rvi17(Va1)</i>)		Количество гибридов, содержащих маркеры к генам <i>Rvi6(Vf)</i> и <i>Rvi17(Va1)</i>	
		шт.	%	шт.	%
Чаравница св.оп.	66	32	48,5	1	1,5
Чаравница × 35/58 <i>M. sieboldii</i>	2	2	100	-	-
Чаравница × Сябрына	48	16	33,3	9	18,7
(Белорусское малиновое + Чаравница) св. оп.	13	4	30,8	-	-
Чаравница × Имрус	28	8	28,6	3	10,7
Всего	157	62	39,5	13	8,3

В целом, распределение среди коллекционных образцов яблони сцепленного с геном фрагмента амплификации, выявляемого с помощью маркера Vf2ARD, говорит о том, что данный маркер может обладать достаточно высокой диагностической ценностью. Соответствующие гену фрагменты выявляются в геноме сортов, связанных с Антоновкой общим происхождением, а также у генетически близких сортов. Маркер не детектируется у диких видов и восприимчивых сортов.

Не всегда молекулярные маркеры, разработанные с помощью анализа популяции, полученной от скрещивания контрастных по данному маркеру родителей, могут быть применимы при анализе больших выборок сортов различного генетического происхождения [27]. В ряде случаев сцепленный с геном маркерный фрагмент может наблюдаться в геноме образцов, данный ген не содержащих. Так, например, для идентификации гена *Rvi4 (Vh4)* был предложен маркер OPB18 [28]. Однако при анализе популяции Regina × Piflora было обнаружено, что маркерный фрагмент длиной 620 п.н. не коррелирует с устойчивыми генотипами [29].

Для идентификации гена *Rvi4 (Vh4/Vr1)* позже был разработан сцепленный маркер AD13-SCAR [29]. Данных о его эффективности пока не приводилось.

Бесспорными диагностическими преимуществами обладают молекулярные маркеры, ограничивающие непосредственно последовательность тестируемых генов, например маркер VfC для идентификации гена *Rvi6(Vf)*. Однако количество таких маркеров пока значительно ниже, чем сцепленных с хозяйственно ценными генами. Сцепленные маркеры могут обеспечивать получение достаточно точных результатов. В частности, результаты, полученные в представленном исследовании при использовании маркера VfC к гену и сцепленного с ним маркера AL07 + AM19, были полностью идентичны. Поэтому при использовании сцепленных маркеров необходимо опираться на знание их диагностической ценности. Молекулярные маркеры, тесно сцепленные с генами, потенциально обеспечивают получение более надежных результатов [14, 30]. Вместе с тем, молекулярные маркеры, которые могут

дать ошибочные результаты при тестировании обширных коллекций, представленных генетически разнородным материалом,

могут быть полезны при анализе потомства, полученного от контрастных по этому маркеру родителей.

Заключение

В результате проведенного исследования были выявлены сорта яблони, содержащие в составе генома ген *Rvi17(Va1)*. Среди них потомки сорта Антоновка и сорта, полученные в результате свободного опыления. Отмечена высокая диагностическая ценность маркера Vf2ARD. Выявлены гибридные сеянцы, полученные

на основе сорта Чаравница, содержащие гены устойчивости к парше *Rvi6(Vf)* и *Rvi17(Va1)*. Они отличаются высокой полевой устойчивостью к парше в эпифитотийные годы. Таким образом, объединение в одном генотипе двух высокоэффективных генов обеспечивает стабильно высокую устойчивость сеянцев к парше.

Список использованных источников

1. Биоэкологические особенности и контроль развития гриба *Venturia inaequalis* Cooscke Winter в яблоневых садах интенсивного типа: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.11 / В.С. Комардина // РНДУП «Институт защиты растений». – Прилуки. – 2008. – С. 14.

2. Towards improvement of marker assisted selection of apple scab resistant cultivars: *Venturia inaequalis* virulence surveys and standardization of molecular marker alleles associated with resistance genes / A. Patocchi [et al.] // Mol Breed. – 2009. – Vol. 24, № 4. – P. 337–347.

3. A proposal for the nomenclature of *Venturia inaequalis* races / V. Bus [et al.] // Acta Hort. – 2009. – Vol. 814. – P. 739–746.

4. The *Vh2* and *Vh4* scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740–7A map to the same linkage group of apple / V.G.M. Bus [et al.] // Mol Breed. – 2005. – Vol. 15. – P. 103–116.

5. Additional allelic genes in *Malus* for scab resistance of two reaction types / D.F. Dayton, E.B. Williams // J Am Soc Hort Sci. – 1970. – Vol. 95. – P. 735–736.

6. Apple scab resistance from R12740–7A, a Russian apple / D.F. Dayton, J.R. Shay, L.F. Hough // Proc Am Soc Hort Sci. – 1953. – Vol. 62. – P. 334–340.

7. Genetics of host–pathogen relationship between to *Venturia inaequalis* races 6 and 7 *Malus* species / G. Benaouf, L. Parisi // Phytopathology. – 2000. – Vol. 90. – P. 236–242.

8. The *Vh8* locus of a new gene–for–gene interaction between *Venturia inaequalis* and

the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740–7A / V.G.M. Bus [et al.] // New Phytol. – 2005. – Vol. 166. – P. 1035–1049.

9. Independent genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis* / D.F. Dayton, E.B. Williams // Proc Am Soc Hort Sci. – 1968. – Vol. 92. – P. 89–94.

10. Vr₂: a new apple scab resistance gene / A. Patocchi [et al.] // Theor Appl Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 1087–1092.

11. Characterisation and genetic mapping of a major scab resistance gene from the old Italian apple cultivar ‘Durello Forli’ / S. Tartarini [et al.] // Acta Hort. – 2004. – Vol. 663. – P. 129–133.

12. Inheritance of *Malus floribunda* clone 812 resistance to *Venturia inaequalis* / G. Benaouf, L. Parisi, F. Laurens // IOBC/WPRS Bull. – 1997. – Vol. 20. – P. 1–7.

13. Inheritance studies of apple scab resistance and identification of Rvi14, a new major gene that acts together with other broad–spectrum QTL / V. Soufflet–Freslon [et al.] // Genome. – 2008. – Vol. 51. – P. 657–667.

14. *Venturia inaequalis* resistance in apple / C. Gessler [et al.] // Crit Rev in Plant Sc. – 2006. – Vol. 25. – P. 473–503.

15. Progress and problems in breeding apples for scab resistance / L.F. Hough [et al.] // Proc Angers Fruit Breed Symp. – 1970.

16. A major resistance gene from Russian apple ‘Antonovka’ conferring field immunity against apple scab is closely linked to the *Vf* locus / F. Dunemann, J. Egerer // Tree Genet. and

Genom. – 2010. – Vol. 6, № 5. – P. 627–633.

17. Совершенствование сортигента яблони в Беларуси / З.А. Козловская // – Минск, – 2003. – P. 168.

18. Results in apple breeding at Dresden–Pillnitz / С. Fischer, М. Fischer // Gartenbauwissenschaft. – 1996. – Vol. 61. – P. 139–146.

19. Яблоня / А.Е. Сябаров // Минск, Ураджай. – 1968. – P. 279.

20. Linkage of *Vfa4* in *Malus x domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* / М.Р. Afuni-an, Р.Н. Goodwin, D.М. Hunter // Plant Pathology. – 2004. – Vol. 53. – P. 461–467.

21. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple / S. Tartarini [et al.] // Plant Breeding. – 1999. – Vol. 118. – P. 183–186.

22. ‘Freedom’ a disease-resistant apple / R.C. Lamb, H.S. Aldwinckle, D.E. Terry // Hort. Science. – 1985. – Vol. 20. – P. 774–775.

23. Identification and mapping of markers for resistance to apple scab from “Antonovka” and “Hansen’s baccata#2” / М. Hemmant [et al.] // Acta Hort. – 2003. – Vol. 622. – P. 153–161.

24. Помология БССР. Атлас плодов ябло-

ни / Под ред. А.Н. Ипатьева. – 1972. – P. 240.

25. Помология. Т. 1. Яблоня / Л.П. Симиренко // Из-во Украинской АСХН, Киев. – 1961. – P. 580.

26. Genetics of the interaction *Venturia inaequalis*–*Malus*: the conflict between theory and reality / С. Gessler // IOBC/WPRS Bull. – 1989. – Vol. 12. – P. 168–190.

27. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием молекулярных маркеров / О.Ю. Урбанович [et al.] // Генетика. – 2006. – Vol. 42, № 5. – P. 675–683.

28. Tagging and mapping scab resistance genes from R12740–7A apple / М. Hemmant, S.K. Brown, N.F. Weeden // J Am Soc Hort Sci. – 2002. – Vol. 127. – P. 365–370.

29. Development of a multiallelic SCAR marker for the scab resistance gene *Vr1/Vh4/Vx* from R12740–7A apple and its utility for molecular breeding / А. Boudichevskaia [et al.] // Tree Genet. and Genom. – 2006. – Vol. 2, № 4. – P. 186–195.

30. Genome Mapping and Breeding in Plants. // Fruits and Nuts. / ed. С. Kole. – Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007. – P. 370.

Дата поступления статьи 2 марта 2011 г.

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

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

Введение

Важнейшим внутренним фактором риска канцерогенеза является нарушение репарационных функций. Так, установлено, что 0,5% популяции человека гетерозиготна по мутациям в гене *hMSH2*, который участвует в репарации неспаренных оснований ДНК (mismatch repair), и эти мутации связаны с высокой частотой возникновения рака толстого кишечника [1]. Имеются доказательства, что наследственный неполипозный колоректальный рак обусловлен мутациями в этом и других сопряженных генах [2, 3]. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, преимущественно контролирующей репарацию двунитевых разрывов ДНК, повышают риск рака молочной железы и яичника, поэтому могут служить биомаркерами предрасположенности к этим заболеваниям [4, 5].

Известно также, что инициации рака способствуют внешние генотоксические воздействия, в результате которых образуются аддукты ДНК, приводящие в конечном итоге к разрывам нитей ДНК, повреждению хромосом и формированию мутаций. Среди аддуктов ДНК особое место занимают окислительные повреждения [6], индуцированные активными формами кислорода (АФК). АФК являются медиаторами радиационного поражения, образуются в организме при проникновении мутагенов непрямого действия и негенотоксичных канцерогенов (подробнее в [7]). Аддукты ДНК, в том числе вызванные АФК, также как одно- и двунитевые разрывы, устраняются в ходе репарации ДНК. Поэтому вполне понятно внимание, которое в последнее время уделяется состоянию генов, контролирующих этот процесс. Можно

ожидать, что безошибочная репарация ДНК будет гарантировать восстановление ее первичной структуры, защищать геном от повреждений, и, следовательно, снижать риск возникновения рака. Таким высокоточным механизмом является эксцизионная репарация ДНК.

Основные системы и функции эксцизионной репарации ДНК

Эксцизионная репарация происходит до репликации ДНК и включает несколько этапов [8]: 1) обнаружение (опознание) повреждения; 2) его маркирование, вероятно, с помощью конформационных изменений ДНК и хроматина; 3) разрезание (инцизия) поврежденной нити ДНК с обеих сторон от повреждения на некотором удалении от него; 4) вырезание поврежденного участка (эксцизия); 5) синтез ДНК *de novo*; 6) сшивание нового материала с предсуществующей нитью.

Выделяют эксцизию нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) [8] и эксцизию оснований ДНК (base excision repair, BER) [9]. Система NER представляет надежную преграду против канцерогенеза, мутагенеза и цитотоксических эффектов. Она узнает и репарирует многие известные повреждения ДНК (вызванные УФ-светом пиримидиновые димеры, другие фотопродукты, сшивки ДНК, широкий спектр химических аддуктов). Однако не все повреждения опознаются ферментами NER. Поэтому эксцизионную репарацию нуклеотидов дополняет система со взаимоперекрывающимися функциями, которая осуществляет вырезание оснований ДНК.

Два пути эксцизионной репарации нуклео-

тидов. Прежде, чем кратко остановиться на некоторых аспектах NER, отметим, что повреждения ДНК приводят к двум основным последствиям: непосредственно влияют на метаболизм ДНК, что вызывает гибель клеток (немедленный цитотоксический эффект), а также могут превращаться в мутации, оказывающие отдаленные эффекты. NER устраняет оба последствия. Этот процесс происходит на всех стадиях клеточного цикла, не зависит от состояния хроматина и не влияет на другие матричные функции: транскрипцию, репликацию, рекомбинацию [8, 10]. Одной из существенных характеристик NER является способность выявлять изменения структуры ДНК, в том числе конформационные, позволяющие отличить нормальную нить от модифицированной вследствие ее повреждения.

Основная ветвь NER, обозначаемая как «global genome excision repair» (GGR), осуществляет глобальную репарацию генома и особенно важна для предотвращения мутаций [8]. Впечатляющим открытием стало наблюдение, что пиримидиновые димеры в активно транскрибируемых генах репарируются более эффективно, чем на участках неэкспрессированного хроматина [10]. На этом основании предложена гипотеза ните- и гено-специфической репарации, которая заключается в том, что любые изменения, которые блокируют работу РНК-полимеразы, служат «антенной повреждения» для энзимов системы эксцизионной репарации [11]. Подсистема NER, которая элиминирует повреждения в транскрибируемой нити активного гена, получила название «transcription-coupled repair» (TCR). Оба механизма описаны у человека, схематично они представлены на рисунке 1.

Большинство генов эксцизионной репарации нуклеотидов открыты при изучении генетических основ пигментной ксеродермы (xeroderma pigmentosum, XP), характеризующейся гиперчувствительностью к

ультрафиолетовому свету, и синдрома Кокейна (Cockayne syndrome, CS) с выраженным нейродегенеративным компонентом [12, 13]. Факторы пигментной ксеродермы XPC, XPE относятся к группе «опознающих» ферментов и находят повреждение ДНК; факторы XPA, XPB, XPD обладают геликазной активностью и способствуют расплетанию нитей ДНК; факторы XPF, XPG, ERCC1 проявляют эндонуклеазную активность, разрезая нить ДНК с 5' и 3' сторон за несколько нуклеотидов до повреждения. Факторы синдрома Кокейна CSA, CSB участвуют в опознании повреждения ДНК в транскрибируемой нити (см. также обзоры [14–16]).

Эксцизия оснований. В отличие от NER, в которой задействованы мультипротеиновые комплексы, при эксцизионной репарации оснований ДНК обнаружение первичного повреждения происходит с помощью ДНК-гликозилаз. ДНК-гликозилазы представлены мономерными энзимами, которые катализируют гидролиз N-гликозидных связей поврежденных, модифицированных или неправильно спаренных оснований, приводя к их удалению из сахарофосфатного остова [9, 10, 17]. Затем остов разрезается эндонуклеазой по фосфодиэфирным связям с обеих сторон (5' и 3') от апуринового (апиридинового) сайта, что способствует удалению участка размером в один нуклеотид между правильно спаренными основаниями. С помощью ДНК-полимеразы этот пробел заполняется определенным дезоксирибонуклеотидтрифосфатом, который отбирается по нуклеотиду противоположной нити и присоединяется ДНК-лигазой (так называемая short-patch repair – репарация «короткой заплатой»). В некоторых случаях необходимо восстановление от 2-х до 10 нуклеотидов – long-patch repair (репарация «длинной заплатой») [18]. Основные этапы и энзимы, участвующие в BER, представлены на рисунке 2 (слева).

Глобальная репарация генома (GGR)

Сопряженная с транскрипцией репарация (TCR)

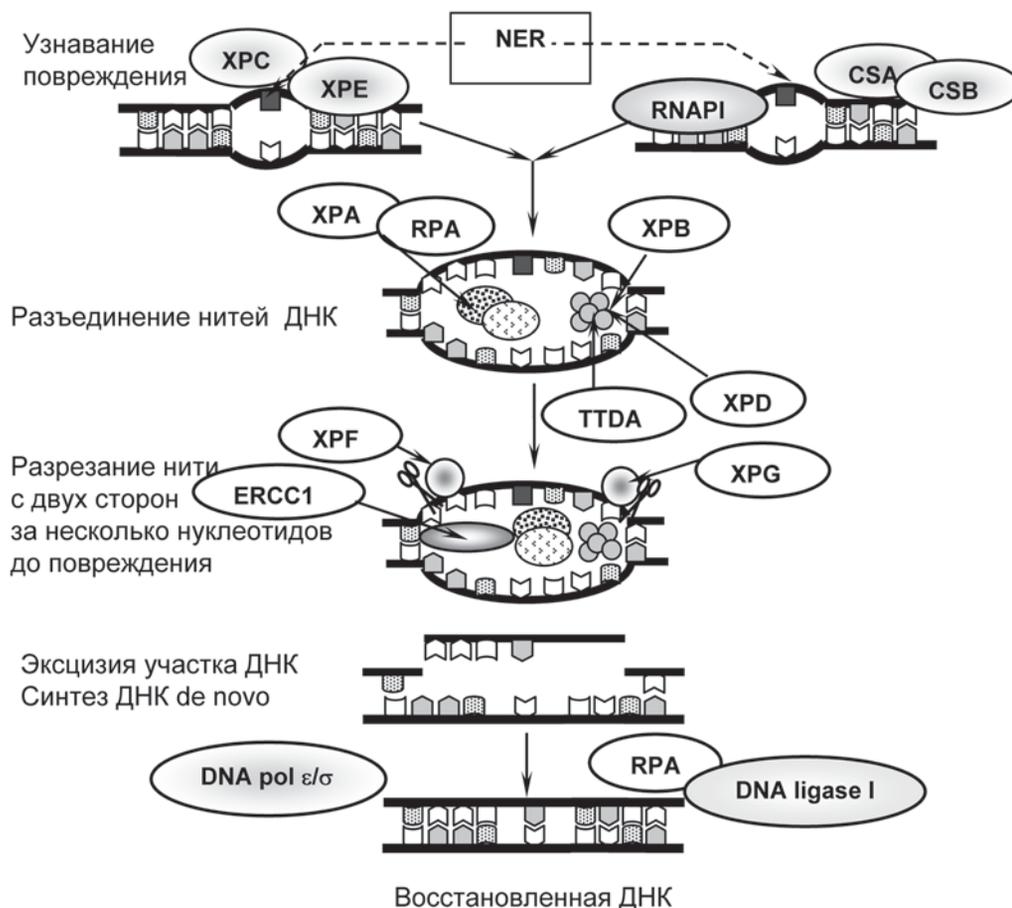
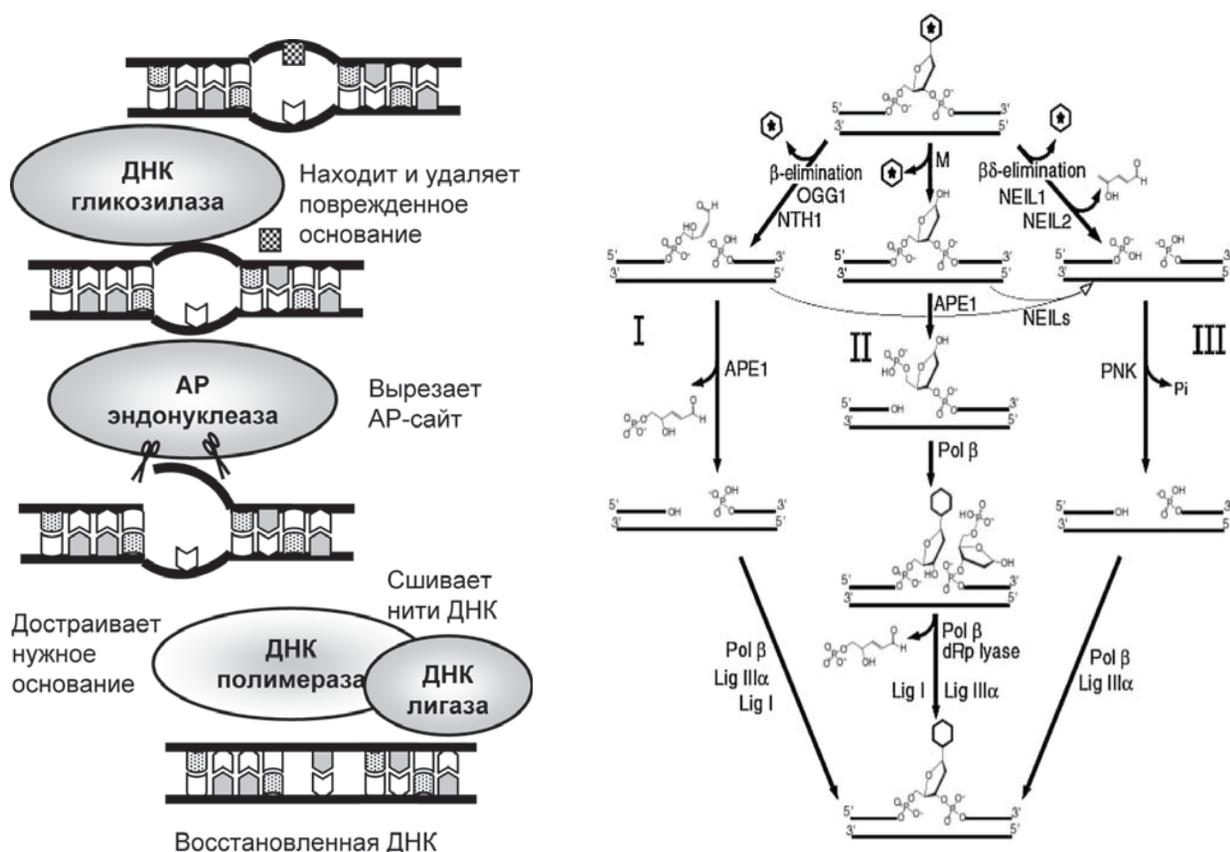


Рис. 1. Эксцизионная репарация нуклеотидов.

XPA–XPG – продукты генов, ассоциированных с пигментной ксеродермой. Как компоненты ветви глобальной репарации нуклеотидов, они узнают поврежденный участок, а также расплетают и разрезают нити ДНК. ERCC1/XPF – гетеродимер с эндонуклеазной активностью. CSA, CSB – продукты генов, ассоциированных с синдромом Кокейна, в ходе транскрипции участвуют в узнавании поврежденного участка ДНК. RNAPII – ДНК-зависимая РНК-полимераза, участвует в транскрипции; RPA – replication protein A (протеин репликации) – связывается с XPA на ранних стадиях NER; DNA pol ϵ/σ – ДНК полимеразы достраивают недостающую нить ДНК после эксцизии поврежденного участка; DNA ligase I – ДНК лигаза сшивает свободные концы нити ДНК.



Hazra et al., 2007

Рис. 2. Эксцизионная репарация оснований.

OGG1 – 8-оксигуанин-ДНК-гликозилаза узнает и удаляет окисленное основание; NTH1, NEIL1, NEIL2 – ДНК гликозилазы, узнающие модифицированное основание и удаляющие его путем β-элиминации; APE1 – AP-эндонуклеаза разрезает нить ДНК с двух сторон от AP-сайта; Pol β – ДНК полимераза; Lig IIIα, Lig I – ДНК лигазы.

Установлено, что BER осуществляет репарацию повреждений ДНК, индуцированных АФК, и тем самым создает мощный барьер против рака. Возможные механизмы BER в зависимости от типа ДНК-гликозилаз рассмотрены в работе Т.К. Hazra с соавторами (2007) и показаны на рисунке 2 (справа) [19].

Таким образом, различные пути эксцизионной репарации ДНК могут расцениваться как механизмы антиканцерогенеза, а молекулярные изменения в структуре соответствующих генов служить биомаркерами предрасположенности либо резистентности к возникновению и развитию рака.

Полиморфизм генов репарации ДНК и его роль в канцерогенезе

Как обсуждалось ранее [16], мутации в генах репарации ДНК приводят к тяжелой наследственной патологии, сопровождающейся нестабильностью генома и злокачественными новообразованиями. Однако гены репарации ДНК, как и другие гены, являются полиморфными, т.е. представлены в популяции несколькими аллелями. Как правило, различия между аллелями одного и того же гена заключаются в незначительных вариациях его генетического кода. Однако даже небольшие изменения в структуре гена, вызывая функциональные нарушения, могут затрагивать формирование индивидуальной чувствительности или устойчивости к внешним мутагенным и канцерогенным воздействиям и, следовательно, влиять на опухолеобразование.

Накапливается все больше данных в пользу того, что различия между частотами полиморфных вариантов генов в группах здоровых людей и онкологических больных дает возможность установить вклад изучаемого поли-

морфизма в риск возникновения определенного заболевания. К наиболее изученным генам BER относятся гены *hOGG1*, кодирующий 8-оксигуанин-ДНК-гликозилазу, и *XRCC1* из группы кросс-комплементирующих генов (X-ray repair cross-complementing, *XRCC*). *XRCC1*, не обладая какой-либо известной каталитической активностью, способствует эксцизионной репарации, взаимодействуя с ДНК-лигазой III и ДНК-полимеразой β . Кроме того, *XRCC1* регулирует активность AP-эндонуклеазы и поли(ADP-рибозо) полимеразы [20]. Последняя осуществляет посттрансляционную модификацию ДНК и координирует процесс эксцизионной репарации оснований [21, 22]. Среди генов, контролируемых NER, изучаются гены, ассоциированные с пигментной ксеродермой, и кросс-комплементирующие гены эксцизионной репарации (excision repair cross-complementing, *ERCC*). В обзоре Ellen L. Goode с соавторами [23] приведены эпидемиологические данные по распространению некоторых полиморфизмов генов эксцизионной репарации у здорового населения (табл. 1).

Таблица 1

Полиморфизмы генов эксцизионной репарации

Гены	Локализация	Полиморфизм*	Частота
Эксцизионная репарация оснований			
<i>OGG1</i>	3p26.2	S326C 1245 <i>c</i> → <i>g</i>	0.22–0.45
		3402 <i>g</i> → <i>a</i>	0.35
		3574 <i>g</i> → <i>a</i>	0.23
		6170 <i>g</i> → <i>c</i>	0.25
		7143 <i>a</i> → <i>g</i>	0.15
		9110 <i>a</i> → <i>g</i>	0.23
		10629 <i>c</i> → <i>g</i>	0.50
		10660 <i>a</i> → <i>t</i>	0.23
		11657 <i>a</i> → <i>g</i>	0.13
		11826 <i>a</i> → <i>t</i>	0.23
<i>XRCC1</i>	19q13.2	R194W 26304 <i>c</i> → <i>t</i>	0.06–0.35
		R280H 27466 <i>g</i> → <i>a</i>	0.00–0.10
		R399Q 28152 <i>g</i> → <i>a</i>	0.14–0.39
Эксцизионная репарация нуклеотидов			
<i>ERCC1</i>	19q13.2	19007 <i>g</i> → <i>a</i>	0.45
<i>XPC</i>	3p25	3'UTR 8092 <i>c</i> → <i>a</i>	0.27
		1457-1461 delins	0.33
<i>XPD</i>	19q13.2	22541 <i>c</i> → <i>a</i>	0.40–0.45
		D312N 23591 <i>g</i> → <i>a</i>	0.33–0.44
<i>XPF</i>	16p13.3	L751Q 35931 <i>a</i> → <i>c</i>	0.06–0.42
		5'TR 2063 <i>t</i> → <i>a</i>	0.31
		30028 <i>t</i> → <i>c</i>	0.33

Примечание. Данные цитируются по [23]; * курсивом выделены замены оснований: *a* – аденин, *g* – гуанин, *c* – цитозин, *t* – тимин.

Предполагается, что аллельные варианты генов эксцизионной репарации могут служить биомаркерами канцерогенеза в различных органах и тканях [23]. Так, анализ полиморфизма S326C гена *OGG1* показал, что генотип CC повышает риск возникновения рака легких и простаты (OR=2.1–2.2 и OR=3.3, соответственно). При изучении полиморфизма гена *XRCC1* (R194W) большинство исследователей наблюдали уменьшение онкологического риска, ассоциированное с аллелем W, что было свойственно различным типам рака, включая рак легкого и мочевого пузыря (OR=0.4 и OR=0.6, соответственно). Другой полиморфизм *XRCC1* (R399Q) оказывал разнонаправленное действие: способствовал развитию рака молочной железы и желудка, но снижал риск рака пищевода и мочевого пузыря [23]. Влияние полиморфизмов генов BER на канцерогенез, особенно в связи с курением, подтверждено и в других работах [24].

Неоднозначные данные, касающиеся системы NER. Например, если мутации в гене *XPD*, безусловно, являются вредными, то роль полиморфизмов этого гена не всегда ясна и часто зависит от возраста пациента и статуса курения [23]. При изучении полиморфизма генов NER у больных раком легкого [25] показан увеличенный риск заболевания у носителей генотипа *ERCC2* 751Gln/Gln (OR = 1.30) и защитный эффект генотипа *XPA* 23G/G (OR = 0.75). Исследователи из Китая на больших выборках, включающих от 4514 до 9018 обследованных, обнаружили повышение онкологического риска при гомозиготных вариантах *XPC* Lys(939)Gln (OR=1.16) and Ala(499)Val (OR=1.24) [26]. При этом вариант (939)Gln увеличивал риск возникновения рака легкого, а вариант (499)Val – рака мочевого пузыря.

На современном этапе большинство авторов склоняется к мнению, что для адекватной оценки риска онкологических заболеваний необходимо расширять молекулярно-генетические исследования, учитывая как этнические особенности, так и межгенные взаимодействия в сочетании с внешними факторами, в том числе обусловленными стилем жизни.

Ассоциация полиморфизмов генов эксцизионной репарации с риском возникновения рака мочевого пузыря

Рак мочевого пузыря (РМП) относится к распространенным онкологическим заболе-

ваниям, частота выявления которого с каждым годом возрастает как в других соседних странах (Польша, РФ), так и Республике Беларусь. РМП проявляет некоторую зависимость от пола, и у мужчин в США занимает 5-е место, а в европейских странах выходит на 4-е место, составляя 7% от общей онкологической заболеваемости [27]. В настоящее время разрабатываются новые подходы, позволяющие усовершенствовать раннюю диагностику заболевания, от которой зависит объем оперативного вмешательства и эффективность лечения. С этой целью внедряются молекулярно-генетические методы. В РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова (г. Минск) проводилась работа по выявлению мутаций гена *p53* для ранней диагностики и мониторинга новообразований мочевого пузыря [28]. Изучение роли аллельного полиморфизма генов репарации ДНК как биомаркеров предрасположенности к уротелиальному раку также представляет перспективное направление. Согласно упомянутым выше данным [23] недостаточный объем материала не позволял однозначно оценить отрицательную либо положительную роль тех или иных полиморфизмов в инициации РМП.

Работы, выполненные за рубежом по определению аллельных вариантов генов эксцизионной репарации нуклеотидов (*XPA*, *XPC*, *XPD*, *ERCC2*) и оснований (*hOGG1*, *XRCC1*) при раке мочевого пузыря [29–33], также дали неоднозначные результаты. Установлена противоположная роль полиморфизмов генов BER *hOGG1* и *XRCC1* в японской популяции: если полиморфизм *hOGG1* 326 (генотип Cys/Cys) встречался чаще у больных (OR=1.85–2.05), то полиморфизм *XRCC1* 399 (генотип Gln/Gln) – у здоровых лиц (OR=0.45–0.37), что свидетельствовало о повышенном онкологическом риске в первом случае и о резистентности к раку – во втором [32]. В то же время изучение 14 полиморфизмов гена *XRCC1* на большой когорте в Великобритании не выявило их связи с риском РМП, за исключением полиморфизма Arg280His, который чаще встречался у курящих больных [30].

Анализ полиморфных локусов в генах NER *XPC*, *ERCC2*, *XRCC1* and *XRCC3* во французской популяции показал, что лишь один из них (*XPC* L939G) связан с риском

РМП [33]. На когорте обследованных из Китая доказана рискованная значимость аллелей *XPD* Arg156Arg (C22541A) и *Lys751Gln* (A35931C) [31], тогда как в итальянской популяции вариант *XPD* (*Lys751Gln*) вел себя нейтрально, а полиморфизмы *XRCC1* A399G и *XRCC3* T241M понижали риск заболевания при курении [29].

Наиболее детальное исследование состояния BER у больных и клинически здоровых лиц проведено в США [34, 35]. Анализ 43 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в 12 генах BER (*OGG1*, *MUTYH*, *APEX1*, *PARP1*, *PARP3*, *PARP4*, *XRCC1*, *POLB*, *POLD1*, *PCNA*, *LIG1* и *LIG3*), выполненный в Национальном Институте рака, показал достоверную ассоциацию с риском РМП трех генов: кодирующих 8-оксигуанин-гликозилазу, поли(ADP-рибозо) полимеразу 1 и ДНК полимеразу β [34], тогда как второй группе ученых не удалось найти прямой корреляции между отдельными SNP и риском канцерогенеза. Более того, частота вариантных генотипов *OGG1* S326C у курящих (OR=0.74) и *ADPRT* V762A у некурящих (OR=0.58) указывала на защитный эффект этих полиморфизмов против РМП [35]. Достоинством цитируемой работы является анализ взаимодействия генотипов и факторов окружающей среды, результаты которого, представленные на рисунке 3, убедительно подтверждают роль курения в этиологии данного заболевания.

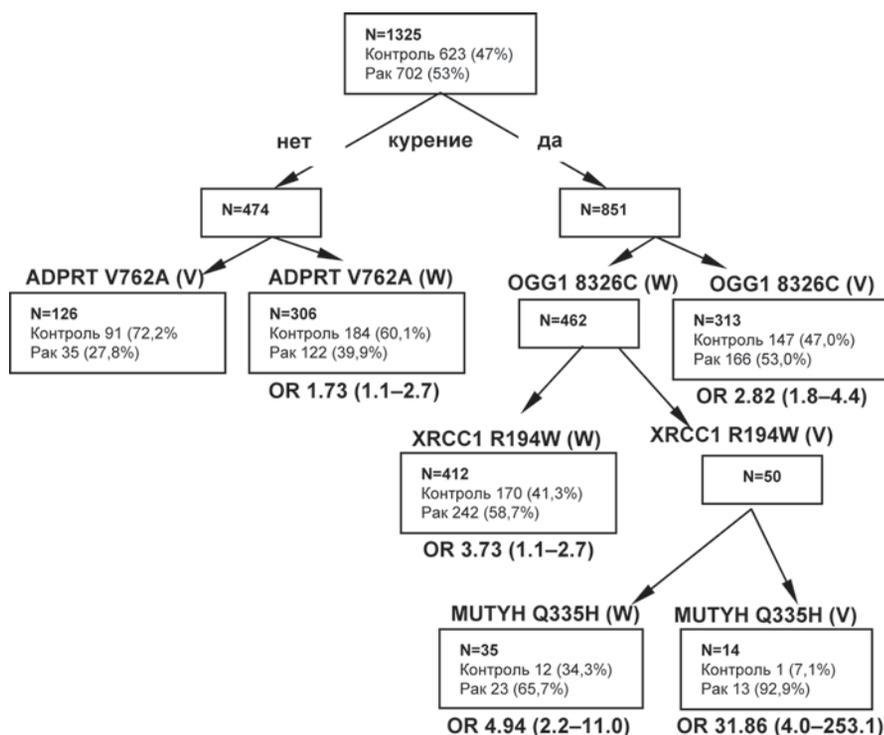


Рис. 3. Эффект взаимодействия генетического полиморфизма BER и статуса курения [35].

W – wild type – дикий тип; V – варианты генотипов

ADPRT – ADP-рибозилтрансфераза, включающая NAD^+ и поли-(ADP-рибозо) полимеразу. *MUTYH* (гомолог *mutY* у *E. coli*) – ДНК гликозилаза, вовлеченная в репарацию окисленных оснований ДНК. Остальные гены и их продукты расшифрованы ранее. OR – odds ratio (отношение шансов).

Более точным оказался многофакторный анализ, учитывающий статус курения и полиморфизмы трех генов: *OGG1* S326C, *APEX1* D148E и *ADPRT* V762A, – результаты которого имели наибольшую предсказательную силу (100%) и

наименьшую ошибку (37.02%, $p < 0.001$) в оценке риска возникновения РМП [35]. Аналогичные крупномасштабные исследования касались полиморфизма генов NER [36, 37], при этом на испанской когорте (1150 боль-

ных и 1149 здоровых лиц) выявлена рисковая значимость полиморфных аллелей в четырех генах из семи по сравнению с гомозиготами дикого типа: *RAD23B* IVS5-15A>G (OR=1.3, p=0.01), *ERCC2* R156R (OR=1.3, p=0.006), *ERCC1* IVS5+33A>C (OR=1.2; p=0.04), and *ERCC5* M254V (OR=1.4; p=0.04) [36]. Ученными из Техасского университета на выборке из 696 больных и 629 здоровых лиц проанализировано 13 полиморфизмов 9-ти главных генов, контролирующих эту систему репарации [37]. В индивидуальных исследо-

ваниях риск РМП зависел только от варианта *XPD* D312N, но сочетание аллелей *CCNH* V270A, *ERCC6* M1097V и *RAD23B* A249V у курильщиков приводило к возрастанию риска заболевания почти в 30 раз (OR=29.6). Взаимодействие этих генов на фоне курения хорошо видно на рисунке 4. Многофакторный анализ, учитывающий курение и неблагоприятные аллели генов *CCNH* V270A, *ERCC6* M1097V, *RAD23B* A249V и *XPD* D312N, обладал наиболее высокой точностью в предсказании рака.

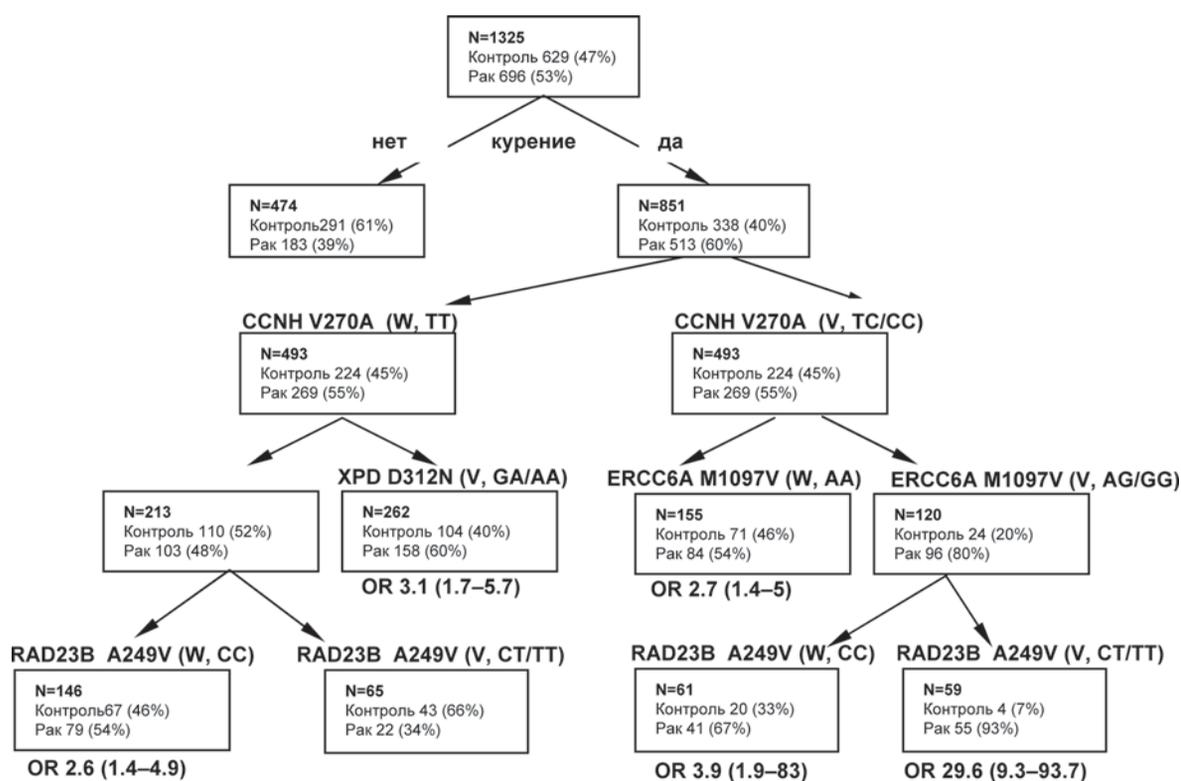


Рис. 4. Эффект взаимодействия генетического полиморфизма NER и статуса курения [37]

W – wild type – дикий тип; V – варианты генотипов.

CCNH – циклин H, участвует в переносе поврежденного участка ДНК; *XPD* – ДНК геликаза; *RCC6* – ДНК-связывающий белок, участвующий в эксцизионной репарации нуклеотидов, сопряженной с транскрипцией; *RAD23B* – в комплексе с XPC участвует в опознании повреждения ДНК.

Таким образом, полиморфные варианты в генах BER и NER вносят существенный вклад в риск развития РМП, что более ярко проявля-

ется через взаимодействие как между генами, так и между генами и факторами окружающей среды.

Заключение

Анализ современного состояния исследований полиморфных вариантов генов эксци-

зионной репарации в качестве биомаркеров онкологического риска в целом и рака мо-

чевого пузыря в частности свидетельствует, что проблема далека от полного разрешения. Ощутимый рост количества публикаций на эту тему за последние 2–3 года подтверждает актуальность и востребованность подобных исследований, представляющих несомненную ценность для практической медицины. Однако обращает на себя внимание некоторая противоречивость результатов, которая, объясняется разными причинами, к числу которых можно отнести этнические различия, характерные и для других генов, а также ткане- и органоспецифичность некоторых полиморфизмов.

Тем не менее, представленный обзор позволяет заключить, что определенные аллели гена *hOGG1*, кодирующего 8-оксигуанин-ДНК гликозилазу, как правило, повышают риск развития рака, тогда как действие полиморфизмов гена *XRCC1* не однозначно по отношению к локализации рака, а при раке мочевого пузыря либо нейтрально, либо направлено против опухолеобразования. Увеличение выборки обследуемых и расширение спектра изучаемых полиморфизмов генов эксцизионной репарации оснований продемонстрировало, что более точный прогноз

дает анализ взаимодействия генов, а также сочетания генов и канцерогенных факторов (курения). При таком подходе выявлено существенное влияние на риск возникновения РМП полиморфизмов *OGG1* S326C, *APEX1* D148E и *ADPRT* V762A. То же самое относится к полиморфизмам генов, ответственных за эксцизионную репарацию нуклеотидов. При индивидуальном анализе среди достаточно большой группы изученных аллелей наиболее стойкая ассоциация наблюдалась между РМП и полиморфизмами гена *XPB*, но многофакторный анализ выявил неблагоприятное сочетание и других генотипов: *CCNH* V270A, *ERCC6* M1097V, *RAD23B* A249V, рискованность которых на фоне курения возрастала в 30 раз.

Таким образом, для адекватной оценки онкологического риска, в частности, риска возникновения и развития рака мочевого пузыря необходимы исследования в конкретной популяции с учетом наиболее распространенных этиологических факторов. Следует также иметь в виду, что точность прогноза увеличивается при изучении взаимодействия полиморфных вариантов различных генов репарации.

Список использованных источников

1. Wagner, R. Mismatch repair and human disease / R. Wagner, M. Radman // *DNA Repair Mechanisms: Impact on Human Diseases and Cancer*. Ed. Jean-Michel H. Vos. – N.Y., Berlin, Heidelberg, Paris: Springer-Verlag, 1995. – P. 151–159.
2. Peltomäki, P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer / P. Peltomäki // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – Vol. 10, № 7. – P. 735–740.
3. Белев, Н.Ф. Роль генетических факторов в этиопатогенезе рака толстой кишки / Н.Ф. Белев // *Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ. Часть I*. Минск, 25–28 мая, 2004 / Минск ОДО «Тонпик», 2004 – С. 64–68.
4. Tutt, A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition / A. Tutt, A. Ashworth // *Trends Mol. Med.* – 2002. – Vol. 8, № 12. – P. 571–576.
5. Turner, N. Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours / N. Turner, A. Tutt, A. Ashworth // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 5, № 4. – P. 388–393.
6. Basu, A.K. DNA damage: Structural and functional consequences / A.K. Basu, J.M. Essigmann // *DNA Repair Mechanisms: Impact on Human Diseases and Cancer*. Ed. Jean-Michel H. Vos. – N.Y., Berlin, Heidelberg, Paris: Springer-Verlag, 1995. – P. 1–24.
7. Кужир, Т.Д. Антимутагены химический мутагенез в системах высших эукариот / Т.Д. Кужир. – Минск: Тэхналогія, 1999. – 267 с.
8. Hoesjmakers J.H.J. Nucleotide excision repair: molecular and clinical implications / J.H.J. Hoesjmakers // *DNA Repair Mechanisms: Impact on Human Diseases and Cancer*. Ed. Jean-Michel H. Vos. – N.Y., Berlin, Heidelberg, Paris: Springer-Verlag, 1995. – P. 126–150.
9. Teebor, G.W. Excision base repair / G.W. Teebor // *DNA Repair Mechanisms: Impact on Human Diseases and Cancer*. Ed. Jean-Michel

- H. Vos. – N.Y., Berlin, Heidelberg, Paris: Springer-Verlag, 1995. – P. 99–123.
10. Lloyd, R.S. DNA damage recognition / R.S. Lloyd, B. Van Houten // DNA Repair Mechanisms: Impact on Human Diseases and Cancer. Ed. Jean-Michel H. Vos. – N.Y., Berlin, Heidelberg, Paris: Springer-Verlag, 1995. – P. 25–66.
11. Mellon, I. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed strand / I. Mellon, P.C. Hanawalt // Nature (London). – 1989. – Vol. 342. – P. 95–98.
12. De Boer, J. Nucleotide excision repair and human syndromes / J. De Boer, J.H.J. Hoeijmakers // Carcinogenesis. – 2000. – Vol. 21, № 3. – P. 453–460.
13. Lehmann, A.R. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy / A.R. Lehmann // Biochimie. – 2003. – Vol. 85, № 11. – P. 1101–1111.
14. Human DNA repair genes / R.D. Wood [et al.] // Science. – 2001. – Vol. 291. – P. 1284–1289.
15. Кужир, Т.Д. Некоторые аспекты прогноза, профилактики и лечения рака с учетом роли репарации ДНК в канцерогенезе (Обзор) / Т.Д. Кужир // Сб. трудов «Молекулярная и прикладная генетика», 2008. – Т. 7, стр. 25–41.
16. Кужир, Т.Д. Репарация ДНК при патологии: синдромы хромосомной нестабильности / Т.Д. Кужир // Весці НАН Беларусі, Сер. Мед. Навук. – 2009. – № 2. – С. 96–102.
17. Hitomi, K. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair / K. Hitomi, S. Iwai, J.A. Tainer // DNA Repair (Amst). – 2007. – Vol. 6, № 4. – P. 410–428.
18. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it / A.B. Robertson [et al.] // Cell Mol. Life Sci. – 2009. – Vol. 66, №6. – P. 981–993.
19. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective / T.K. Hazra [et al.] // DNA Repair (Amst). – 2007. – Vol. 6, № 4. – P. 470–480.
20. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro / K.W. Caldecott [et al.] // Nucleic. Acids Res. – 1996. – Vol. 24, № 22. – P. 4387–4394.
21. Herceg, Z. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death / Z. Herceg, Z-Q. Wang // Mutat. Res. – 2001. – Vol. 477. – P. 97–110.
22. Malanga, M. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network / M. Malanga, F.R. Althaus // Biochem. Cell Biol. – 2005. – Vol. 83, № 3. – P. 354–364.
23. Goode E.L. Polymorphisms in DNA repair genes and association with cancer risk / E.L. Goode, C.M. Ulrich, J.D. Potter // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2000. – Vol. 11. – P. 1513–1530.
24. Tudek, B. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers / B. Tudek // Mol. Aspects Med. – 2007. – Vol. 28, № 3–4. – P. 258–275.
25. Kiyohara C. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis / C. Kiyohara, K. Yoshimasu // Int. J. Med. Sci. – 2007. – Vol. 4, № 2. – P. 59–71.
26. Associations between XPC polymorphisms and risk of cancers: A meta-analysis / L. Qiu [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2008. – Vol. 44, № 15. – P. 2241–2253.
27. Gene polymorphisms in bladder cancer / M. Franekova [et al.] // Urol. Oncol. – 2008. – Vol. 26, № 1. – P. 1–8.
28. Торбашевич, Е.С. Использование аллель-специфической полимеразной цепной реакции для выявления мутаций гена p53 с целью ранней диагностики и мониторинга новообразований мочевого пузыря / Е.С. Торбашевич, С.А. Красный, С.П. Фещенко // Мед. новости. – 2003. – № 9. – С. 70–72.
29. Polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC3*, *XPB*, interaction with environmental exposures, and bladder cancer risk in a case-control study in northern Italy / M. Shen [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2003. – Vol. 12. – P. 1234–1240.
30. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and bladder cancer risk / S.C. Sak [et al.] // BMC Genet. – 2007. – 8:13 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/8/13>).
31. Polymorphisms of the DNA gene XPD and risk of bladder cancer in a Southeastern Chinese population / J. Shao [et al.] // Cancer Genet. Cytogenet. – 2007. – Vol. 177, № 1. – P. 30–36.
32. Arizono, K. DNA repair gene *hOGG1* co-

don 326 and *XRCC1* codon 399 polymorphisms and bladder cancer risk in a Japanese population / K. Arizono, Y. Osada, Y. Kuroda // *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2008. – Vol. 38, № 3. – P. 186–191.

33. DNA repair gene *ERCC2*, *XPC*, *XRCC1*, *XRCC3* polymorphisms and associations with bladder cancer risk in a French cohort / L. Fontana [et al.] // *Anticancer Res.* – 2008. – Vol. 28. – P. 1853–1856.

34. Genetic variation in the base excision repair pathway and bladder cancer risk / J.D. Figueroa [et al.] // *Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 121, № 2. – P. 233–242.

35. High-order interactions among genetic variants in DNA base excision repair pathway

genes and smoking in bladder cancer susceptibility / M. Huang [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2007. – Vol. 16, № 1. – P. 84–91.

36. Genetic variation in the nucleotide excision repair pathway and bladder cancer risk / M. García-Closas [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2006. – Vol. 15, № 3. – P. 536–542.

37. High-order interactions among genetic polymorphisms in nucleotide excision repair pathway genes and smoking in modulating bladder cancer risk / M. Chen [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2007. – Vol. 28, № 10. – P. 2160–2165.

Дата поступления статьи 14 апреля 2011 г.

ТИПИРОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ПСЕВДОМОНАД С ПОМОЩЬЮ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА МЕЖГЕННОГО 16S–23S рРНК СПЕЙСЕРА

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

Введение

Известно, что в связи с развитием филогенетической систематики бактерий род *Pseudomonas* подвергся существенной таксономической ревизии [1, 2]. Одним из ее итогов стало описание многих новых родов бактерий, относящихся к различным классам типа *Proteobacteria*. Тем не менее, благодаря описанию новых видов, и, в меньшей мере, ревизии других таксонов количество видов рода *Pseudomonas* постоянно росло. Поскольку в основу проведенной ревизии был положен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, корректная идентификация псевдомонад стала невозможной без использования данного метода. На сегодня этот вид анализа является универсальным, наиболее надежным и удобным методом молекулярно-генетической характеристики, позволяющим провести определение родовой принадлежности самых разнообразных в таксономическом отношении бактерий [3]. Однако его результаты следует интерпретировать с осторожностью при проведении видовой идентификации, принимая во внимание, что основным критерием принадлежности бактерий к одному виду является родственность их геномов [4], которая не всегда может быть гарантирована высоким уровнем сходства генов 16S рРНК [5]. В связи с этим для корректного определения видовой принадлежности бактерий часто необходимо проведение дополнительных генети-

ческих тестов. В частности, может оказаться полезным анализ спейсерного участка расположенного между генами 16S и 23S рРНК, для которого характерен высокий уровень межвидового и внутривидового полиморфизма [6, 7].

Ранее нами была продемонстрирована генетическая и таксономическая гетерогенность коллекционных бактерий из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, определенных по классической схеме идентификации как *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida* [8]. В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК флуоресцирующие псевдомонады были распределены по различным филогенетическим группам рода *Pseudomonas*, при этом видовая принадлежность с достаточной степенью уверенности могла быть установлена менее чем у половины исследованных штаммов. Таксономическое положение большей части исследованных бактерий было определено лишь до уровня группы видов, а его уточнение требовало проведения дополнительных исследований с помощью альтернативных методов.

Целью настоящей работы была оценка возможности использования метода рестрикционного анализа межгенового 16S–23S рРНК спейсера (ITS-RFLP) для дифференциации штаммов флуоресцирующих псевдомонад при проведении таксономических исследований.

Материалы и методы

В работе использовали двенадцать штаммов флуоресцирующих псевдомонад из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (БИМ), часть из которых была депонирована также во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (табл. 1). Культуры исследуемых бактерий выращивали на среде ТУ [5].

Культуры исследуемых бактерий выращивали на среде ТУ [5].

Таблица 1

Использованные в работе штаммы флуоресцирующих псевдомонад

Таксономическая принадлежность по каталогу БИМ [9]	Обозначение и номер штамма	Таксономическая принадлежность по результатам филогенетического анализа [8]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar I	БИМ В-98 (= ВКМ В-1476 = №11)	<i>Pseudomonas cedrina</i>
	БИМ В-100 (= ВКМ В-1459 = С-5-5)	<i>Pseudomonas orientalis</i>
	БИМ В-143 (= R-3)	<i>Pseudomonas</i> sp. (группа <i>Pseudomonas fluorescens</i>)
	БИМ В-158 (= ВКМ В-1461 = 5-2)	<i>Pseudomonas cedrina</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar IV	БИМ В-187 (= R-30)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar V	БИМ В-86 (= <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 345)	<i>Pseudomonas</i> sp. (группа <i>Pseudomonas Vancouverensis</i>)
	БИМ В-99 (= ВКМ В-1471 = №1)	<i>Pseudomonas</i> sp. (группа <i>Pseudomonas Vancouverensis</i>)
	БИМ В-147 (= R-14)	<i>Pseudomonas</i> sp. (группа <i>Pseudomonas fluorescens</i>)
	БИМ В-149 (= R-18)	<i>Pseudomonas</i> sp. (группа <i>Pseudomonas fluorescens</i>)
	БИМ В-156 (= ВКМ В-1472 = №2)	<i>Pseudomonas</i> sp. (группа <i>Pseudomonas Vancouverensis</i>)
<i>Pseudomonas putida</i>	БИМ В-228 (= M-3)	<i>Pseudomonas Vancouverensis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	БИМ В-137 (= <i>Pseudomonas fluorescens</i> В = №19)	<i>Pseudomonas</i> sp. (группа <i>Pseudomonas fluorescens</i>)

Амплификацию 16S-23S межгенного спейсера осуществляли, придерживаясь ранее изложенной методики [5]. Продукты амплификации анализировали с помощью гель-электрофореза как непосредственно, так и после обработки рестриктазами *AluI*, либо *TaqI*, либо смесью рестриктаз *AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *NotI*, *PstI* ("Fermentas", Литва). Электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле в стандартном трис-боратном буфере половинной концентрации. Гели окрашивали этидиум бромидом и фотографировали при просвечивании ультрафиолетовыми лучами.

Кластерный анализ результатов риботипирования проводили с помощью программы TREECON for Windows (version 1.3b) [10] по методу невзвешенного попарного арифметического среднего (UPGMA). Матрицы исходных данных получали вручную после визуализации гелей, обозначая присутствие фрагмента как 1, а его отсутствие – 0. Массив данных для кластерного анализа объединял в себе все матрицы, полученные при обработке результатов электрофоретического разделения продуктов амплификации и продуктов рестрикции.

Результаты и их обсуждение

При анализе продуктов амплификации межгенного 16S–23S спейсера всех исследуемых бактерий обнаруживался фрагмент размером около 850 п.о. (рис. 1А). У штаммов БИМ

В-158, БИМ В-98, БИМ В-187, БИМ В-137, БИМ В-228 имела место амплификация дополнительного фрагмента, размеры которого варьировали от 620 п.о. до 940 п.о. Помимо

основных выявлялись минорные ампликоны, что, однако, не позволяло проводить достаточно надежную дифференциацию штаммов.

Обработка продуктов амплификации межгенных 16S-23S участков смесью рестриктаз

позволила выявить дифференцирующие полосы в рестрикционных профилях штаммов БИМ В-158, БИМ В-98, БИМ В-187, БИМ В-86, БИМ В-137, БИМ В-149 и БИМ В-228 (рис. 1Б).

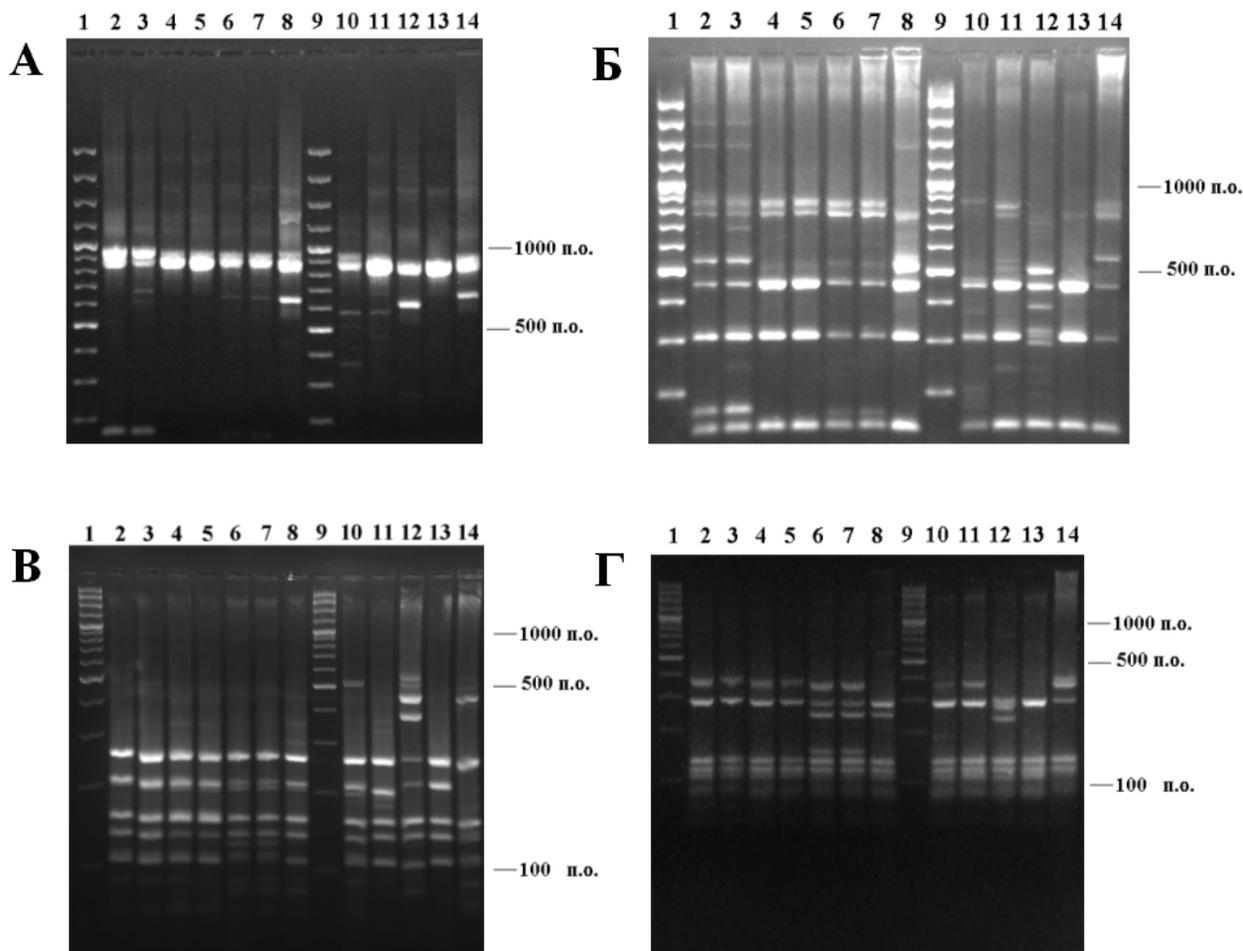


Рис. 1. Амплификация 16S-23S межгенного спейсера флуоресцирующих псевдомонад (А) и дифференциация штаммов при обработке продуктов амплификации смесью рестриктаз (Б), рестриктазами *TaqI* (В) или *AluI* (Г).

Дорожки: 1, 9- маркер молекулярной массы - Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder производства Fermentas (Литва); 2 – штамм БИМ В-158, 3 – БИМ В-98, 4 – БИМ В-156, 5 – БИМ В-99, 6 – БИМ В-143, 7 – БИМ В-147, 8 – БИМ В-187, 10 – БИМ В-86, 11 – БИМ В-100, 12 – БИМ В-137, 13 – БИМ В-149, 14 – БИМ В-228.

Как видно на рис. 1В, при обработке продуктов амплификации межгенных 16S–23S спейсеров рестриктазой *TaqI* были обнаружены отличия состава рестрикционных фрагментов для пары штаммов БИМ В-143 - БИМ В-147 и бактерий БИМ В-86, БИМ В-100, БИМ В-137, БИМ В-149, БИМ В-228. При этом различия

рестрикционных профилей у штаммов БИМ В-143, БИМ В-147 и БИМ В-86 заключались в присутствии единственных дополнительных специфических фрагментов.

В результате обработки продуктов амплификации рестриктазой *AluI* (рис. 1Г) была обнаружена уникальность рестрикционных профилей

бактерий БИМ В-187, БИМ В-137, БИМ В-149 и пары штаммов БИМ В-143 – БИМ В-147.

Кластерный анализ, проведенный на основании сравнения всех четырех профилей межгенных 16S-23S участков исследуемых бактерий установил родственность одиннадцати исследованных бактерий, образывавших большой устойчивый кластер (рис. 2). При этом внутри кластера выделялись три устойчивых пары штаммов, образующих единые

ветви в дендрограмме. Значения бутстрапа находились на высоком уровне для всех сформированных пар: штаммы БИМ В-158 – БИМ В-98 (76), штаммы БИМ В-156 – БИМ В-99 (95), БИМ В-143 – БИМ В-147 (99), что свидетельствует о статистической достоверности их объединения. Кластеризация всех остальных исследуемых бактерий в дереве была неустойчивым, о чем свидетельствовали показатели бутстрапа не превышавшие 35.

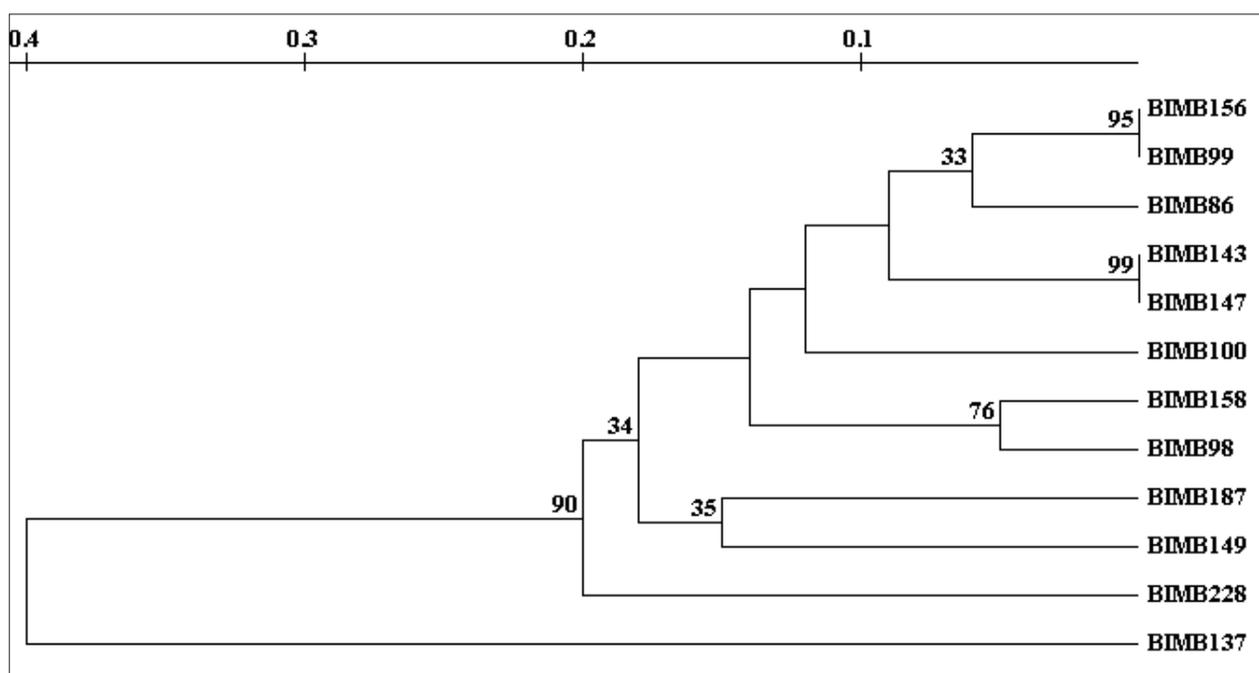


Рис. 2. UPGMA дендрограмма, построенная на основании анализа результатов риботипирования штаммов флуоресцирующих псевдомонад.

Значения бутстрапа вычислены на основании анализа 100 деревьев. Показаны значения бутстрапа выше 30. Шкала – генетическая дистанция, вычисленная как доля несовпадающих фрагментов по методу Nei and Li, 1979 [11].

Результаты проведенного кластерного анализа (рис. 2) хорошо согласуются с ранее представленными нами результатами филогенетического анализа и типирования исследуемых бактерий с помощью Рер-ПЦР [8]. Использование любого из этих методов приводило к выводу о тесном генетическом родстве штаммов в парах БИМ В-158 – БИМ В-98, БИМ В-156 – БИМ В-99 и БИМ В-143 – БИМ В-147, свидетельствующем о принадлежности к одному и тому же геномовиду. При этом для сравни-

тельного анализа геномной ДНК с помощью ERIC- и BOX-ПЦР характерна более высокая разрешающая способность при дифференциации штаммов рода *Pseudomonas* в сравнении с риботипированием в силу более высокой вариабельности повторяющихся последовательностей бактерий и образования более сложного состава фрагментов при их амплификации. Подобная закономерность отмечена и в ряде других работ по генотипированию бактерий различной родовой принадлежности [12, 13]. Расширением спек-

тра используемых рестриктаз при проведении рестрикционного анализа межгенного 16S–23S спейсера можно повысить дифференцирующую

способность метода и достигнуть достоверной идентификации штаммов на видовом и внутривидовом уровнях.

Заключение

Таким образом, применение метода рестрикционного анализа межгенного 16S–23S спейсера позволило выявить среди исследуемых штаммов флуоресцирующих псевдомонад генотипические группы, степень родства внутри которых позволяет относить входящие в них

бактерии к одному и тому же геномовиду. Полученные результаты свидетельствует о возможности использования этого метода в таксономических исследованиях штаммов рода *Pseudomonas* с целью определения их видовой принадлежности.

Список использованных источников

1. Recent change in classification of the pseudomonads: an overview / K. Kersters [et al.] // *System. Appl. Microbiol.* – 1996. – V. 19. – P. 465–477.

2. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence / Y. Anzai [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2000. – V. 50. – P. 1563–1589.

3. Olsen G.J. Ribosomal RNA: a key to phylogeny / G.J. Olsen, C.R. Woese // *FASEB J.* – 1993. – V. 7. – P. 113–123.

4. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology / E. Stackebrandt [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52. – P. 1043–1047.

5. Бажанов, Д.П. Филогенетическая идентификация трех штаммов ризосферных бактерий на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и генетического типирования / Д.П. Бажанов, К.К. Яцевич, А.А. Бажанова // *Микробиология.* – 2010. – Т. 79, № 3. – С. 394–404.

6. Jensen, M.A. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction–amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms / M.A. Jensen, J.A. Webster, N. Straus // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59. – P. 945–952.

7. Gurtler V. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S – 23S

rDNA spacer region / V. Gurtler, V.A. Stanisich // *Microbiology.* – 1996. – V. 142 – P. 3–16.

8. Бажанов, Д.П. Таксономическая гетерогенность коллекционных штаммов флуоресцирующих псевдомонад / Д.П. Бажанов, К.К. Яцевич // *Микробиология.* – 2011. – Т. 80, № 1. – С. 93–99.

9. Каталог культур микроорганизмов / Под ред. чл.–корр. НАН Беларуси Э.И. Коломиец. – Минск, 2006. – 166 с.

10. Van de Peer Y. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for Microsoft Windows environment / Y. Van de Peer, R. De Wachter // *Comput. Appl. Biosci.* – 1994. – V. 10. – P. 569–570.

11. Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W.–H. Li // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – V. 76. – P. 5269–5273.

12. . Vila M.J., Marcos A., De Anta M.T.J. A comparative study of different PCR–based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus* – *A. baumannii* complex / M.J. Vila, A. Marcos, M.T.J. A De Anta // *J. Med. Microbiol.* – 1996. – V. 44. – P. 482–489.

13. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods / S. Appuhamy [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – V. 35. – P. 288–291.

Дата поступления статьи 14 февраля 2011 г.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КОЛЛЕКЦИИ ЗЕРНОБОБОВЫХ ВИР ПОСРЕДСТВОМ RAPD-МАРКИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ

ГНУ ГНЦ РФ Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.М. Вавилова
Российская Федерация, 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42-44

Введение

В настоящее время в генбанках растительной гермплазмы молекулярно-генетические исследования становятся общепринятым методом изучения сохраняемого разнообразия. Они применяются для генотипирования растительных геномов с целью выявления генетического родства образцов, упрощения поиска и извлечения полезных генов, контролирующих качество и устойчивость к патогенам и стрессам; выявления источников редких аллелей; определения степени генетической эрозии генофонда культур; выявления филогенетических связей между таксонами; уточнения таксономического статуса отдельных видов и родов и т.д. Молекулярные маркеры становятся также необходимым инструментом правильной организации работы с коллекцией, а именно: идентификации дублированных образцов; проверки аутентичности долго сохраняемых и многократно пересеваемых образцов; создания репрезентативных выборок, максимально отражающих генетическое разнообразие коллекции (core-коллекций); паспортизации образцов и т.п.

В настоящей статье изложены первые результаты RAPD-маркирования коллекционного генофонда ВИР, полученные кураторами коллекций генетических ресурсов зернобобовых.

Известно, что RAPD-анализ может служить своеобразным экспресс-методом выявления генетического полиморфизма и источником уникальных локус-специфичных маркеров, что особенно актуально для работы с генетическим разнообразием. Диагностические возможности RAPD-технологии успешно проиллюстрированы на многочисленных примерах описания генетического разнообразия культурных и диких растений [1-10].

Целью работы явилось определение возможности использования RAPD-анализа для оптимизации работы с коллекцией зернобобовых ВИР (поиска дублетов); выявления генетической близости образцов, имеющих разное происхождение и направления использования; а также необходимого для многовидовых коллекций уточнения таксономического статуса образца, совершенствования имеющихся морфо-биологических систем и выявления филогенетических связей. Наряду с генотипированием образцов использовали данные предварительного изучения морфологических и биологических свойств образцов, позволяющие кураторам лучше ориентироваться в результатах, полученных посредством применения молекулярных технологий.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе использованы образцы коллекции зернобобовых ВИР, подобранные сообразно целям и задачам исследования.

Фасоль (*Phaseolus vulgaris* L.) – 20 образцов. Проанализированы сорта: Сакса – 6 образцов, Black Valentine – 8 образцов, Чудо

Парижа – 2 образцов, Contender – 4 образцов.

Горох – 95 образцов – селекционных и местных сортов российской и восточно-европейской селекции разных направлений использования, различных морфотипов и относящиеся к разным агро-экологическим группам.

Представители трибы *Vicieae* Bronn – 250

образцов 51 вида из 4 родов: *Vicia* L., *Lens* Mill., *Pisum* L., *Lathyrus* L.

Представители 40 видов рода *Lathyrus* L. – 96 образцов с известными морфологическими характеристиками и имеющие различное происхождение: *Lathyrus sativus* L., *cicera* L., *angulatus* L., *annuus* L., *aphaca* L., *articulatus* L., *cassius* Boiss., *chloranthus* Boiss., *chrysanthus* Boiss., *ciliolatus* Rech. F., *clymenum* L., *frolovii* Rupr., *gloeospermus* Warb. And Eig., *gmelinii* Fritsch., *gorgoni* Parl., *heterophylus* L., *hierosolymitanus* Boiss., *hirsutus* L., *japonicus* Willd., *latifolius* L., *linifolius* (Reichard) Baessler, *maritimus* (L.) Bigel., *mulkak* Lipsky., *niger* (L.) Bernch., *nissolia* L., *ochrus* (L) DC., *odoratus* L., *palustris* L., *pisiformis* L., *pratensis* L., *pseudocicera* Boiss., *setifolius* L., *spaericus* Retz., *sylvestris* L., *rotundifolius* Willd., *roseus* Steven, *tingitanus* L., *tuberosus* L., *vernus* (L.) Bernch.

Выделение ДНК проводили по описанной ранее методике [11] из 10-14-дневных проростков индивидуальных растений каждого образца, а также из смеси 5-10 проростков семян одного образца. Количество ДНК, экстрагируемое при использовании указанного метода, было не менее 0,5 мкг ДНК на образец. Чистота полученных препаратов составляла $OD_{260/280} = 1,6-1,9$. Каждый эксперимент проводили в двух повторностях. Всего было выделено и проанализировано 614 препаратов ДНК представителей трибы *Vicieae*.

RAPD анализ. Реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) объемом 25 мкл содержала 20 нг геномной ДНК, 0,2 мкМ праймера(ов), 200 мкМ каждого: dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 2,5 мМ MgCl₂ и Taq-полимеразы в инкубационном буфере. ПЦР проводили в амплификаторе Teche (США) в следующих условиях: цикл 1 – 5 мин. при 95°C; циклы 2-35, 1 мин. при 95°C, 1 мин. при 36°C и 2 мин. при 72°C; цикл 36 – 10 мин. при 72°C. Продукты реакции разделяли элек-

трофорезом в 1,5% агарозном геле с добавлением этидиум бромид и документировали с помощью системы Transilluminator UVP Bio-Doc-It™ Imaging System, модель M-20. Размеры амплифицированных фрагментов определяли при использовании в качестве маркера 1 kb SmartLader 1700-02 (Нидерланды).

Для фасоли использовали 5 праймеров: ET 1/18, ET 2/18, ET 4/18, ET 6/18, IT 1/18, ранее примененных для выявления сортовых различий [12].

Для гороха использовали 5 праймеров, выявляющих полиморфизм *P. sativum*: OPA11, OPA16, OPA19, OPC2, OPC4 (Operon Technologies, USA).

Для оценки геномного полиморфизма 250 образцов из трибы *Vicieae* были подобраны праймеры OPA01, OPA10, OPA11, OPA14, OPA16, OPA17, OPA19, OPH02, OPH03, OPH06, OPH09, OPK01, OPK04, OPK08, OPK09, OPC02, OPC14 (Operon Technologies, USA).

Статистический анализ данных включал составление бинарных матриц по каждому из праймеров, в которых отмечалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме. Каждый RAPD-фрагмент рассматривался как отдельный генетический локус. Характер и степень RAPD изменчивости анализировали в отношении праймера и образца. На основании суммарной матрицы RAPD-спектров с помощью компьютерного программного пакета NTSYSpc 2.02 были определены генетические дистанции между исследуемыми образцами. Для построения дендрограмм, демонстрирующих филогенетические отношения между изучаемыми образцами видов рода *Lathyrus* и образцов рода *Pisum*, применили метод невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием программ TREECON и STATISTICA 7.0)

Результаты и обсуждение

Фасоль (*Phaseolus vulgaris* L.). Коллекция фасоли в ВИРе насчитывает 7517 образцов, поступавших в нее в течение почти ста лет. За это время в коллекции накопилось определенное число дублетных образцов, имеющих

одинаковое название сорта, но поступавших в ВИР в разное время, из разных мест и зарегистрированных под разными номерами. Об идентичности таких образцов можно судить по морфологическим, фенологическим и хо-

зайственным признакам при одновременном посеве. Однако списание таких образцов на основе только фенотипического сходства предполагает риск потери определенного генетического разнообразия. Возможность использования молекулярных методов для выявления дублированных образцов позволит делать это с большой степенью достоверности.

RAPD-анализ образцов одного сорта выявил следующее.

Сорт Сакса: 3 образца (кк-1198, 8534, 11677) являются дублетами и могут быть записаны как один номер каталога ВИР; 3 образца (кк-9635, 10378, 14217) показали отличия по компонентному составу амплифицированных фрагментов;

Сорт Чудо Парижа: 2 образца (кк-46, 51) различаются по компонентному составу и дублетами не являются;

Сорт Contender: 2 образца (кк-11241, 11674) идентичны между собой и являются дублетами, равно как и кк-11779, 14214. Внутри каждой из этих пар с помощью указанных праймеров различий не выявлено, однако между ними выявлены;

Сорт Black Valentine: все 8 образцов (кк-178, 559, 7802, 8218, 8211, 8407, 10060, 10104) имели различные амплифицированные фрагменты и не могут быть признаны дублетами.

Таким образом, подтверждена неправомерность списания из коллекции образцов, имеющих одинаковое название и сходных фенотипически без их молекулярного генотипирования. Среди таких образцов, проверенных RAPD-маркерами оказались как истинные дубликаты, так и генетически разный материал (Буравцева, Алпатьева, 2007).

Горох (*Pisum sativum* L.) в вировской коллекции представлен 8504 образцами, что предполагает большое генетическое разнообразие. Перед вировцами и селекционерами стоит задача максимально эффективного использования генетического потенциала вида в селекции. Однако из работ, проведенных зарубежными учеными по генотипированию сортов гороха западно-европейской селекции, стало очевидным, что, несмотря на значительные успехи в создании современных сортов, их генетическая основа парадоксально узка по сравнению с большим генетическим разнообразием вида *P. sativum* [14].

Агроэкологическое разнообразие, большое число местных сортов, сортов разных направлений использования, сохраняемых в коллекции ВИР, дает основание предполагать и соответствующее генотипическое разнообразие, которое необходимо выявлять и систематизировать для оптимального использования в селекции.

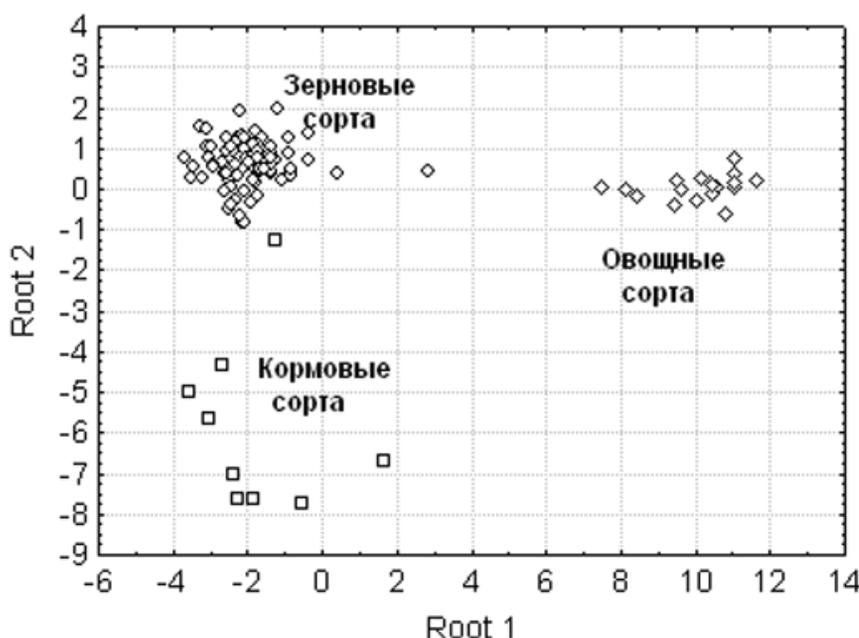


Рис. 1. Расположение образцов гороха разных направлений использования в пространстве двух канонических осей (Root 1 и Root 2).

Предварительная оценка 46 морфологических, фенологических и агрономических признаков 95 образцов позволила выявить их дифференциацию по направлениям использования. Определены признаки, имеющие наибольшее значение для разделения групп и определяющие их достоверные различия, а именно – форма семян, окраска цветка, наличие антоцианового полукольца прилистников, степень изогнутости боба, тип листа, поверхность семян, число продуктивных узлов и число бобов на растении. По совокупности этих признаков можно установить принадлежность образца к группе использования (рис. 1).

В результате RAPD анализа 85 из этих образцов суммарно выявлено 49 полиморфных фрагментов. Число полиморфных фрагментов на праймер варьировало от 8 до 12. При этом для каждого образца были получены уникальные RAPD-спектры фрагментов ДНК. Однако фрагменты, характерные для сортов, отсутствовали.

Исследование генетической близости образцов на основе общей матрицы полученных и обработанных данных RAPD-анализа ДНК в виде дендрограммы, показало сходство овощных сортов, из которых более 90% сгруппировались в одном кластере. Кормовые сорта оказались достаточно дистанцированными от овощных и также сгруппировались в одном кластере. Исходными по отношению к обеим группам, по-видимому, являются зерновые сорта, проявляющие генетическую близость к той и другой группе (рис. 2). Как по результатам дискриминационного анализа (рис. 1), так и молекулярного маркирования (рис. 2) кормовой образец

к-8764 попадает в группу зерновых сортов. Морфологические и агрономические характеристики этого образца обнаруживают у него такие несвойственные другим кормовым сортам признаки как неосыпаемость, детерминантный тип роста стебля, низкорослость, крупносемянность, что ставит под сомнение определение данного образца как кормовой.

Сопряженный анализ морфологических, биологических, агрономических данных и агро-экологической дифференциации образцов, и данных, полученных на основе RAPD-анализа, не выявил топологии полученных дендрограмм.

Таким образом, проведенный нами с указанным выше набором праймеров RAPD-анализ не может служить методом сортовой идентификации сортов гороха, но позволяет классифицировать образцы по группам использования.

Триба Виковых. К трибе *Vicieae* относятся экономически значимые роды *Lathyrus*, *Vicia*, *Lens*, *Pisum*. По совокупности морфобиологических признаков триба считается наиболее совершенной в семействе *Fabaceae* Lindl., но вместе с тем очень проблематичной в плане таксономии и филогении. Наличие у целого ряда видов диагностических признаков, характерных для разных родов трибы, служит причиной множества мнений о количестве реальных родов в ней и таксономической принадлежности видов к родам. До настоящего времени вызывают сомнения границы родов и видов, т.к. в них сочетаются черты прогрессивной эволюции и редукции с общими признаками предковых форм и четко выражен параллелизм.

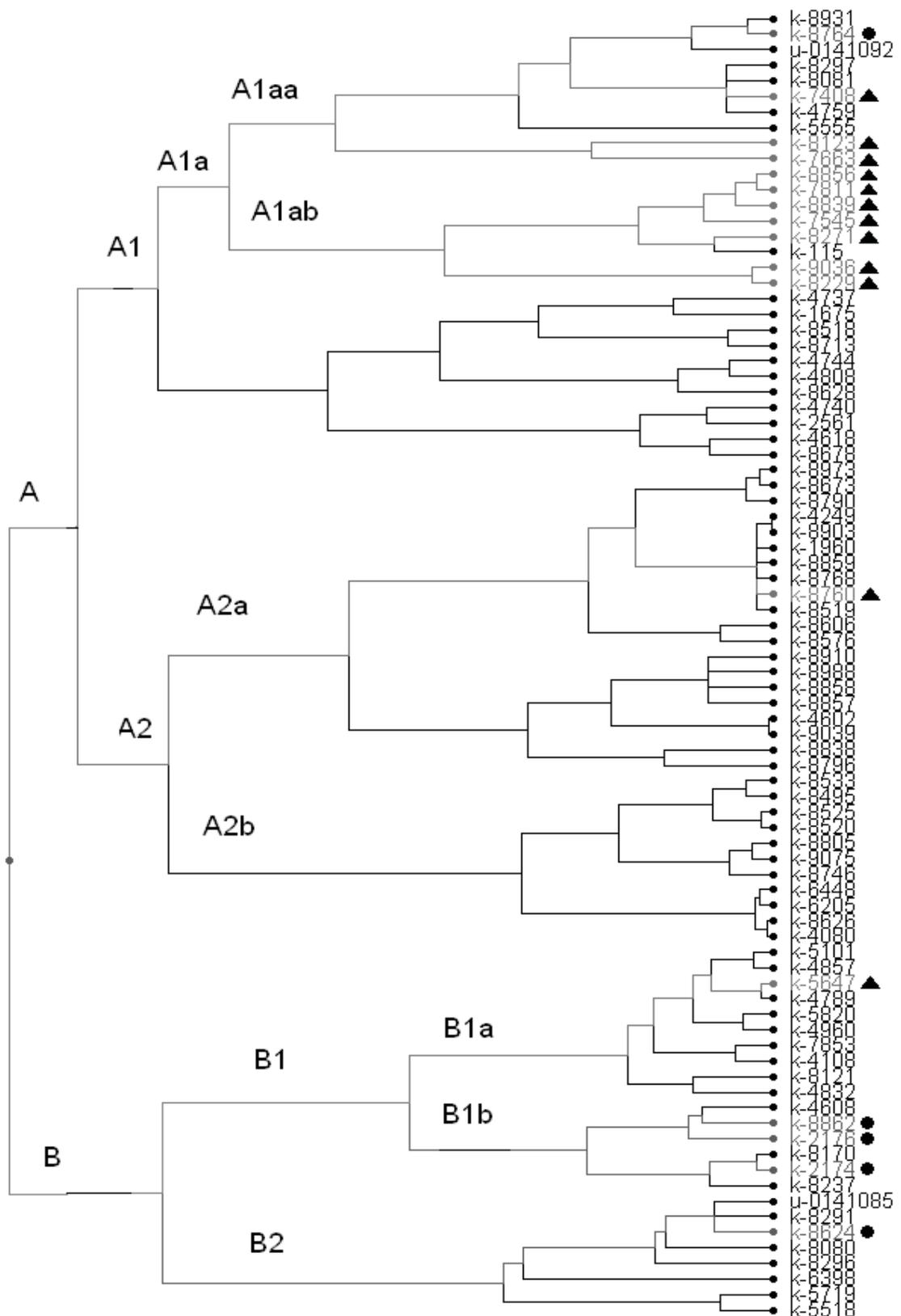


Рис. 2. Дендрограмма генетических различий 85 образцов гороха, построенная на основе сравнительного анализа 49 полиморфных амплифицированных RAPD-фрагментов. (Использовано 5 RAPD праймеров).
 ▲ - овощные сорта, ● – кормовые, без символа - зерновые).

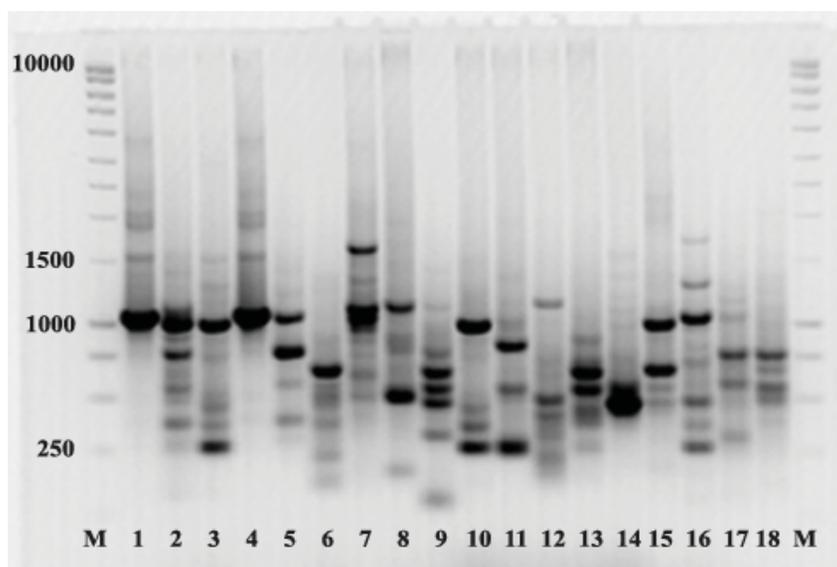


Рис. 3. Электрофоретические спектры RAPD фрагментов 16 видов трибы *Viciae* (праймер ОРН03).

М – маркер молекулярной массы SmartLader 1700-02 (Нидерланды).

1, 4 – *Vicia unijuga* A. Br.; 2 – *Lathyrus japonicus*; 3 – *Pisum elatius*; 5 – *V. sativa* L.; 6 – *V. narbonensis* L.; 7 – *V. hirsuta* L. Gray; 8 – *V. peregrina* L.; 9 – *V. villosa* Roth; 10 – *P. sativum*; 11 – *Lens culinaris* Medik; 12 – *V. ervilia* L. Willd.; 13 – *V. faba* L.; 14 – *L. sativus*; 15 – *L. sylvestris*; 16 – *L. ochrus*; 17 – *L. vernus*; 18 – *L. gmelinii*.

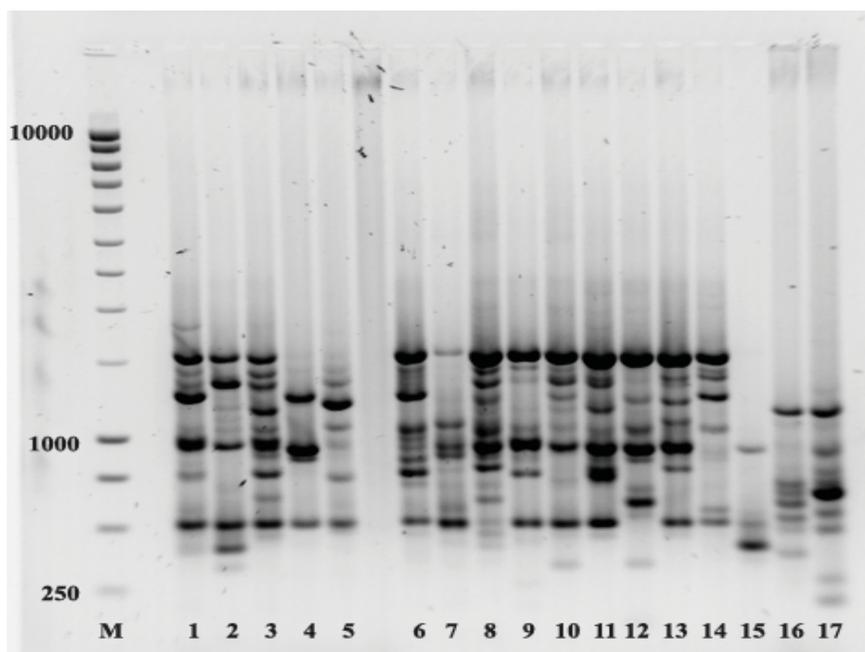


Рис. 4. Электрофоретические спектры RAPD фрагментов 15 образцов разного происхождения вида *L. pratensis* (1-15), 1 образца *L. latifolius* (16) и 1 образца *L. sylvestris* (17) (праймер ОРК04). М – маркер молекулярной массы SmartLader 1700-02 (Нидерланды).

1 – И-591793 (Франция), 2 – И-592364 (Италия), 3 – к-593944 (Финляндия); 4, 5 – И-0139314 (Россия, Карелия), 6 – И-060192 (Казахстан); 7 – И-073657 (Россия, Тюменская обл.); 8 – И-073659 (Россия, Омская обл.); 9 – И-077063 (Россия, Свердловская обл.); 10 – И-077614 (Россия, Архангельская обл.); 11 – И-094254 (Россия, Краснодарский кр.); 12 – И-0122324 (Закарпатье); 13 – И-0139319 (Россия, Ленинградская обл.); 14 – И-0140535 (Россия, Алтай); 15 – к-0139312 (Россия, Карелия); 16 – И-310163 (Италия); 17 – И-591756 (Италия).

Триба слабо дифференцирована, имеет огромный ареал, несколько центров первичного и вторичного происхождения. Кроме того, многие крупные роды трибы не изучались в монографическом плане в мировом масштабе, а были предметом внимания флористов на ограниченных участках ареала.

Эти сложности создают целый ряд препятствий в работе с коллекцией.

С целью прояснения некоторых спорных вопросов систематики трибы было предпринято молекулярное маркирование образцов, относящихся к разным родам и видам, разные по коллекционному статусу: сорта научной и народной селекции, дикие формы.

Большинство исследованных видов отличались значительным внутривидовым полиморфизмом. Основная зона разделения фрагментов находилась в пределах от 150 до 3000 п.н. (рис. 3, 4). В целом учитывали 452 амплифицированных фрагмента. В результате для каждого из анализируемых образцов были идентифицированы индивидуальные RAPD-спектры амплифицированных фрагментов ДНК.

Для геномов представителей трибы *Viciaeae* был определен мономорфный фрагмент с подвижностью 1000 пар оснований (ОРН₆₁₀₀₀), который присутствовал в спектрах всех изученных видов и один фрагмент с подвижностью 1800 пар оснований (ОРН₆₁₈₀₀), характерный для видов *Lens*, *Pisum*, *Vicia* [15]. Воспроизводимость на уровне 300-2000 п.н. была практически 100%, за исключением ряда минорных фрагментов, которые не учитывали при подсчете.

Были установлены фрагменты специфичные для некоторых секций *Lathyrus*. Для ряда видов чины были получены мономорфные видоспецифичные ампликоны, которые могут служить в качестве видоспецифичных маркеров. Всего было получено 40 видоспецифичных фрагментов.

Данные по 45 образцам – представителям 44 видов четырех родов были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в RAPD-спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно. На основе матрицы 452 полиморфных фрагментов ДНК построена единая обобщающая дендрограмма (рис. 5).

На дендрограмме все роды трибы не образуют четких клад, однако ряд видов, в частности, *Vicia faba* L., *Vicia ervilia* и др., формируют самостоятельные ветви, что говорит о возможности выделения их в самостоятельные таксоны (роды) и что имеет подтверждение в длительной истории их классификации.

Виды *Pisum elatius* (Bieb.) Aschers et Graebn. и *P. sativum* L. характеризуются бутстреп поддержкой 100%, что показывает их большое родство и ставит под сомнение правомерность возведения в ранг вида *P. elatius* разновидности посевного гороха *P. sativum* subsp. *elatius* [16]. Прояснились некоторые вопросы структуры секций рода. Более или менее четко дифференцированными оказались группы, соответствующие секциям: *Cicerula* (Medik.) Gren et Godr., *Clymenum* (Miller) Dumort, *Eulathyrus* Ser., *Aphaca* (Miller) Dumort, *Pratensis* Bassler, *Linearicarpus* Kupicha, *Nissolia* (Miller) Dumort. Эта дифференциация в целом соответствует используемой нами и наиболее принятой в мире системе [17], за исключением одного принципиального разногласия, о котором мы писали ранее: необоснованности включения нутовидных чин из секции *Cicerula* в секцию *Lathyrus* [18, 19]. Виды секции *Orobus* (L.) Gren et Godr. не образуют единой клады и представлены самостоятельными ветвями, что свидетельствует об их особом статусе и возможной неправомочности включения их в род *Lathyrus*. Кроме того, полученные данные выявили значительную разнородность оробовидных видов чин и вик, что ставит под сомнение точку зрения А.К. Станкевич [20] и целого ряда ученых, объединяющих их в самостоятельный род *Orobus* L.

Проведенный нами анализ подтвердил близость видов *L. articulatus* и *L. clymenum* (на кладограмме бутстреп индекс равен 79%), но позволил усомниться в их объединении [17, 21] в один вид, и встать на позиции авторов, признающих самостоятельность *L. articulatus* [22-24] (рис. 5, 6).

Таким образом, в итоге проведенного исследования показана возможность идентификации, как отдельных образцов, так и видов трибы Виковых с помощью RAPD анализа (рис. 3, 4, 6). Мономорфные, специфические и воспроизводимые RAPD фрагменты могут быть использованы в качестве маркеров некоторых видов и секций.

Следует отметить, что целый ряд вопросов детализации статуса и определения объема родов по-прежнему остается спорным в си-

стематике трибы *Viciae* и не может быть решен на основе полученных в настоящем исследовании данных.

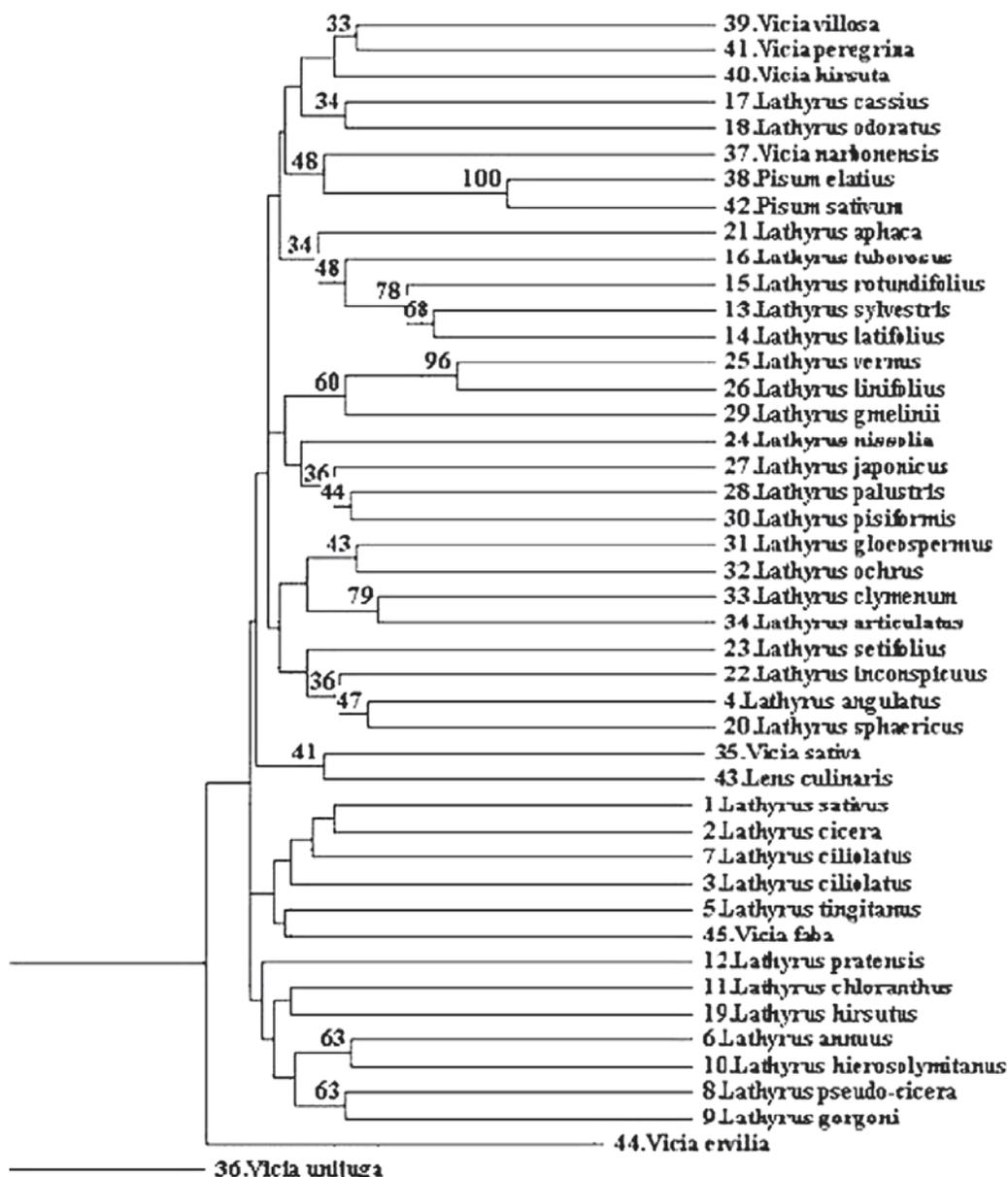


Рис. 5. Дендрограмма, полученная на основе сравнительного анализа 452 полиморфных амплифицированных RAPD фрагментов 45 представителей 44 видов трибы *Viciae*.

Заключение

RAPD-анализ показал себя как надежный метод генотипирования образцов коллекций генетических ресурсов растений и может быть использован для разных целей: оптимизации работы с коллекцией генетических ресурсов

растений; определения уровня внутривидового разнообразия; классифицирования образцов по типам использования; уточнения таксономического статуса образцов и выявления филогенетических связей.

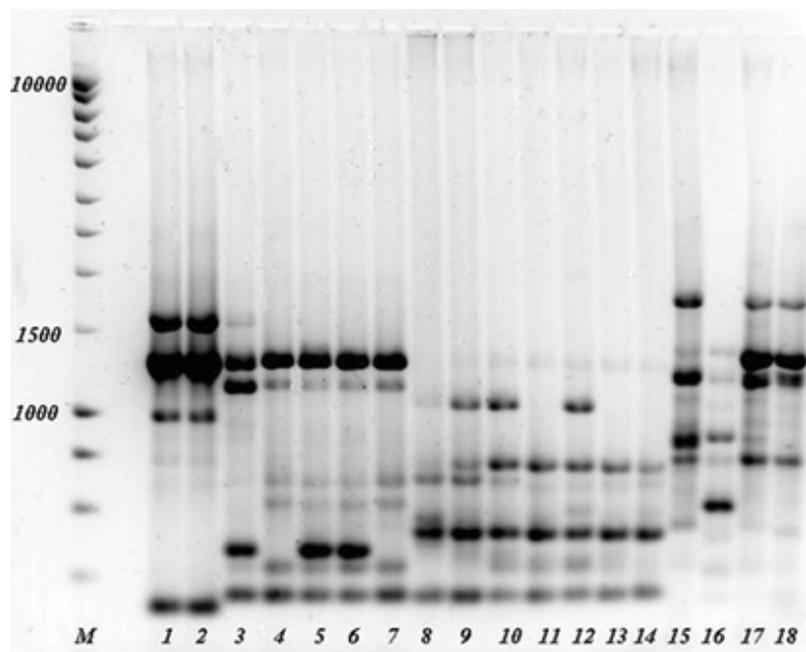


Рис. 6. Электрофоретические спектры RAPD фрагментов 2 образцов *L. gloeospermus*. (1,2); 5 образцов *Lathyrus articulatus* L. (3-7), 7 образцов *L. clymenum* L. (8-14), 4 образцов *L. aphaca* L. (15-18) (праймер ОРК09). М – маркер молекулярной массы SmartLader 1700-02 (Нидерланды).

1-И-593734 (Сирия), 2 – И-593823 (Сирия), 3 – к-1369 (Марокко), 4 – к-1375 (Венгрия), 5 – к-1417 (Австралия), 6 – к-1439 (Португалия), 7 – к-1791 (о.Крит), 8 – к-1370 (Болгария), 9 – к-1371 (Германия), 10 – к-1374 (Чехословакия), 11 – к-1430 (Австралия), 12 – к-1431(Португалия), 13 – к-1663 (Греция), 14 – к-1792 (о.Крит), 15 – к-1293 (Индия), 16 – к-1603 (Азербайджан), 17 – к-1606 (Афганистан), 18 – к-1673 (Краснодарский кр.).

Выявленный нами различный уровень внутривидового разнообразия генома у целого ряда видов в сопоставлении с их фенотипическим разнообразием и агрономической ценностью может служить ценным ориентиром для использования коллекционных образцов

в селекции. Полученные данные о геномном полиморфизме образцов коллекции дополнили паспортные базы данных.

Работа частично поддержана грантами РФФИ 06-04-48869-а, 09-04-00574-а.

Список использованных источников

1. Генетическая дифференциация евразийского подвида мягкой пшеницы по данным RAPD-анализа / П. П. Стрельченко [и др.] // Аграрная Россия. – 2002. – № 3. – С.11–24.
2. Использование метода RAPD анализа в определении генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Lycopersicon* (Tourm.) Mill. / Е.З. Кочиева [и др.] // Генетика. – 2002. – Т. 38. – № 6. – С. 874–880.
3. Перчук, И.Н. Изучение видового разнообразия овса с использованием RAPD –анализа / И.Н. Перчук, И.Г. Лоскутов, К. Окуно // Аграрная Россия. – 2002. – № 3. – С.43–44.
4. Род *Syringa*: молекулярное маркирование видов и сортов /Е. З. Кочиева [и др.] // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 1. – С. 37–40.
5. Гостимский, С.А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров / С. А. Гостимский, З. Г. Кокаева, Ф. А. Коновалов // Генетика. – 2005. – Т. 41. – № 4. – С. 480–492.
6. Лемеш, В.А. RAPD-анализ межвидового полиморфизма льна (род *Linum*) / В.А. Лемеш, М.В. Шут, Л.В. Хотылева. // Информ. Вестн.

ВОГиС. – 2005. – Т. 9. – № 4. – С. 490–494.

7. Малаева, Е.В. Использование RAPD молекулярных маркеров для решения вопросов систематики дальневосточных видов актинидии / Е.В. Малаева [и др.] // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: РБО, XII съезд. – Петрозаводск, 2008. – Ч. 1. – С. 47–49.

8. Горюнова, С.В. Молекулярный анализ филогенетических отношений диплоидных видов эгилопса секции *Sitopsis* / С.В. Горюнова, Н.Н. Чикида, Е.З. Кочиева // Генетика. – 2008. – Т. 44. – № 1. – С. 137–141.

9. Перчук, И.Н. Генетическое разнообразие скандинавских сортов овса посевого из коллекции ВИР / И.Н. Перчук, И.Г. Лоскутов // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: РБО, XII съезд. – Петрозаводск, 2008. – Ч.1. – С. 58–59.

10. Рыжова, Н.Н. RAPD анализ геномного полиморфизма представителей семейства Lemnaceae / Н.Н. Рыжова, Е. З. Кочиева, К. Г. Скрябин // Генетика. – 2008. Т. 44. – № 3. – С. 360–364.

11. Edwards, S.K. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analyses / S. K. Edwards, C. Johnstone, C. Thompson // Nucleic Acids Res. – 1991. – V. 19. – N 6. – P. 1349.

12. Nowosielski, J. Molecular research on the genetic diversity of polish varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. / J. Nowosielski, W. Podyma, D. Nowosielska // Cell Mol. Biol. Letters. – 2002. – № 7. – P. 753–762.

13. Буравцева, Т.В. Выявление дублетных образцов в коллекции фасоли ВИР с помощью RAPD-анализа / Т. В. Буравцева, Н. В. Алпатьева // Материалы II Вавиловской международной конференции «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы», Санкт-Петербург, 26–30 ноября 2007 г. / ВИР – Санкт-Петербург, 2007. – С. 428–429.

14. Diversity within *Pisum sativum* using

protein- and PCR-based markers / A. Baranger [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 108, № 7. – P. 1309–1321.

15. RAPD – анализ видового полиморфизма. рода Чина *Lathyrus* L. семейства *Fabaceae* Lindl. / М. А. Вишнякова [и др.] // Информ. вестн. ВОГиС. 2008. – Т. 12, № 4. С. 7–25.

16. Федотов, В. С. Горох. / В.С. Федотов. М., 1960. – 259 с.

17. Kupicha, F. K. The infrageneric structure of *Lathyrus* L. / F. K. Kupicha // Notes from the Royal Botanic Garden.– Edinburg. – 1983. – V. 41. – N 2. – P. 209–244.

18. Молекулярные подходы к решению вопросов филогении и систематики рода *Lathyrus* L. / М.О. Бурляева [и др.] // Материалы 4-ой Междунар. науч. конф. «Биологическое разнообразие. Интродукция растений», Санкт-Петербург, 5–8 июня 2007 г. / Санкт-Петербург, 2007. – С. 25–26.

19. Molecular-phylogenetic study of tribe Viciae (Adans.) Bronn family Fabaceae Lindl. / М.О. Burlyaeva [et al.] // 6-th European Conference on Grain Legumes, Lisbon, Portugal. – 2007. – P. 249.

20. Станкевич, А. К. Культурная флора. Вика. /А. К. Станкевич, С. И. Репьев; под ред. С.И. Репьева. – С.–Петербург: ВИР, 1999. – 490 с.

21. Asmussen, С.В. Chloroplast DNA character s, phylogeny, and classification of *Lathyrus* (Fabaceae) / С.В. Asmussen, A. Liston // Am. J. Bot. – 1998. – V. 85. – P. 387–401.

22. Чефранова, З. В. Род *Lathyrus* L. / З.В. Чефранова // Ред. Федорова А.А. – Л.: Флора Европейской части СССР, 1987. – Т. 6. – С. 147–172.

23. Systematic relationships in *Lathyrus* sect. *Lathyrus* (Fabaceae) based on amplified fragment polymorphism (AFLP) data / A. Badr [et al.] // Can. J. Bot. – 2002. – V. 80. – P. 962–969.

24. Бурляева М.О. Об объеме вида *L. cluvenum* L. (*Fabaceae*). // Сборник трудов международной конференция памяти Е. Н. Синской. «Генетические ресурсы культурных растений». Санкт-Петербург. 9–11 декабря 2009, – С. 156–159.

Дата поступления статьи 229 апреля 2011 г.

Ю.М. Борисов¹, В.Н. Бахарев², Е.В. Черепанова¹, А.М. Спрингер³, А.П. Каштальян⁴,
З.З. Борисова¹, С.М. Мижуй², В.Н. Орлов¹

ПОЛИМОРФИЗМ ХРОСОМНЫХ РАС ОБЫКНОВЕННОЙ БУРОЗУБКИ (*SOREX ARANEUS*, INCSECTIVORA) БЕЛАРУСИ

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук
Российская Федерация, г. Москва, 119071, Ленинский пр-т, 33

²Мозырский государственный педагогический университет им. И.П. Шамякина
Республика Беларусь, 247760, г. Мозырь, ул. Студенческая, 28

³Витебский государственный университет им. П.М. Машерова
Республика Беларусь, 210038, г. Витебск, пр. Московский, 33

⁴Березинский биосферный заповедник
Республика Беларусь, 211188, Витебская область, Лепельский р-н, п. Домжерицы

Введение

Элементарной эволюционной структурой вида является популяция. К настоящему времени накопилось достаточно данных, свидетельствующих о гетерогенности каждой конкретной популяции организмов как на генетическом, так и на фенотипическом уровнях. Хромосомный уровень организации не является исключением, и в ходе микроэволюции в популяциях фиксируются определенные (не всегда стабильные) кариотипы. «Хромосомный полиморфизм» обозначает структурную изменчивость отдельных хромосом или целых хромосомных наборов (например, полиморфизм по В-хромосомам) среди особей одного вида в пределах конкретной популяции [1]. Существует множество гипотез о роли хромосомных перестроек в видообразовании [2], но проблема хромосомного видообразования остается нерешенной.

Одной из самых распространенных структурных перестроек хромосом является робертсоновская (центромерно-центромерная) транслокация. В результате таких перестроек меняется число хромосом ($2n$) при постоянном числе плеч (NF). Благодаря двум особенностям робертсоновских слияний, их иногда используют для реконструкции филогенетических связей популяций в качестве стабильного генетического маркера. Во-первых, робертсоновские соединения часто фиксируются в популяциях (т. е. их частота достигает 100%), и поэтому могут использоваться как диагностические характеристики внутривидовых форм.

Во-вторых, метацентрические хромосомы, гомологичные по одному из плеч (монобрахиальная гомология), несовместимы в одной популяции, поэтому особи – носители разных метацентриков занимают парapatрические ареалы и по хромосомным характеристикам можно определить границы первоначального контакта расселяющихся популяций.

У обыкновенной бурозубки, *Sorex araneus* Linnaeus, 1758, на всем ее обширном ареале от Байкала до Британских островов за счет робертсоновских транслокаций число хромосом варьирует от $2n=20$ до $2n=33$, тогда как число плеч остается неизменным - NF=40. При описании кариотипа обыкновенной бурозубки каждое плечо хромосомы обозначается буквами в алфавитном порядке, начиная от самого крупного, согласно номенклатуре хромосом разработанной ISACC [3]. Хромосомная система определения пола у *S. araneus*, как и у других близких к ней видов рода *Sorex*, необычная: XY1Y2 у самцов и XX у самок. Три пары аутосом, *af*, *bc* и *tu*, неизменны, плечи *j* и *l* почти всегда присутствуют как метацентрики и лишь изредка – как акроцентрики, а 10 плеч аутосом, *g*, *h*, *i*, *k*, *m*, *n*, *o*, *p*, *q* и *r*, могут либо присутствовать как акроцентрики, либо формировать различные метацентрики. Многие популяции *S. araneus* различаются между собой робертсоновскими соединениями 10 пар акроцентрических хромосом *g-r* в различных комбинациях. Эти пары акроцентрических хромосом и образующиеся из них ме-

тацентрики (например *hi*, *hk* или *hn*) являются диагностическим признаком при описании хромосомных рас обыкновенной бурозубки [3]. В работах по цитогенетике обыкновенной бурозубки хромосомными расами называют группы популяций, занимающие смежные ареалы, которые характеризуются наличием определенных метацентрических хромосом общего происхождения (в гомо- или гетерозиготном состоянии) или их отсутствием [4]. Название расы соответствует населенному пункту, в окрестностях которого была впервые описана новая хромосомная форма [4]. К настоящему времени описано 72 хромосомные расы *S. araneus* [5, 6].

При исследовании хромосомной изменчивости обыкновенных бурозубок внимание было сосредоточено на таких основных темах, как роль Робертсоновских перестроек

в микроэволюционных процессах формо- и видообразования и гибридизация различных хромосомных рас. Анализ географического распространения хромосомных перестроек позволяет в ряде случаев проследить современные или существовавшие в прошлом генные потоки между популяциями. В восточной части ареала обыкновенной бурозубки от Байкала до западной границы России обнаружена 21 хромосомная раса [5]. Для этих рас характерно парапатрическое распространение (т.е. особи разных рас занимают смежные, но не перекрывающиеся территории с четкими границами) [7, 8].

В статье приведены новые данные о кариотипах и их изменчивости в популяциях обыкновенной бурозубки на территории Беларуси и обсуждается гипотеза о формировании современных популяций этого вида.

Материалы и методы

Нами были обследованы 88 особей *S. araneus* из 14 пунктов на территории Беларуси и 9 особей из трех пунктов в Псковской области России (Табл. 1, Рис 1). Хромосомные препараты приготовлены по стандартной методике из клеток костного мозга и селезенки. Иден-

тификацию хромосом проводили по рисунку G-окраски в соответствии с международной номенклатурой хромосом этого вида [3]. Полученные результаты исследований, вместе с данными, опубликованными ранее, приведены в таблице 1.

Результаты и обсуждение

В 14 пунктах (табл.1) на территории Беларуси нами выявлено пять хромосомных рас обыкновенной бурозубки: раса Западная Двина (Wd) (1 пункт), Борисов (Bs) (7 пунктов), Туров (Tu) (2 пункта), Киев (Ki) (1 пункт), Беловеж (Bi) (2 пункта). Ранее в Беларуси была обнаружена раса Лепель [9, 10] и раса Бобруйск [10]. Все эти расы в разной степени полиморфны по диагностическим хромосомам, их кариотипы включают от 0 до 10 пар акроцентриков (табл. 1).

Севернее Беларуси (Россия, Тверская и Псковская обл.) распространены хромосомные расы – Псков (Ps), Западная Двина (Wd) и Москва (Mo) [8, 11–15; данные настоящего сообщения], восточнее (Россия, Брянская и Калужская обл.) – раса Нерусса (Ne) [9], южнее (Украина) – раса Нерусса и Киев (Ki) [10]; западнее (Польша) – раса Беловеж [16], северо-западнее (Литва и Польша) – раса Жувинтас

(Zu) [10] (рис. 1). В отличие от популяций *S. araneus* на территории Беларуси, Литвы и Украины, полиморфных по диагностическим слияниям, популяции, распространенные севернее и восточнее Беларуси, характеризуются мономорфными, преимущественно метацентрическими, кариотипами (расы Псков, Западная Двина и Москва) (рис. 1, табл. 1), и популяции разных рас распространены парапатрически [8, 14–15].

Так, в популяциях расы Западная Двина в верхнем течении рек Западная Двина и Ловать (табл.1, рис.1: п. *Wd1-4*) распространен мономорфный метацентрический кариотип (XX/XY_1Y_2 , *af, bc, jl, tu, gm, hk, ip, no, qr*) [8, 13-15] и данные настоящего сообщения (табл. 1).

Распространение расы Западная Двина к востоку в верховьях реки Западная Двина и восточнее г. Смоленска ограничивает раса Москва (XX/XY_1Y_2 , *af, bc, jl, tu, g/m, hi, kr, no*,

pq) (рис. 1: *Mo1, 2*). На водоразделе рек Ловати и Западной Двины, в бассейне реки Волкота и оз. Лучанское, обнаружена зона контакта рас Западной Двина и Москва (табл. 1, рис. 1: п. *Mo1 Wd2*) [14]. В 5 км северо-восточнее озера Лучанское нами выявлена контактная

зона трех хромосомных рас: Западная Двина, Москва и Селигер (XX/XY_1Y_2 , *af, bc, jl, tu, g/o, hn, ik, m/q, pr*) [15, 17]. Распространение расы Западная Двина на север в этом регионе ограничивает хромосомная раса Селигер [15].

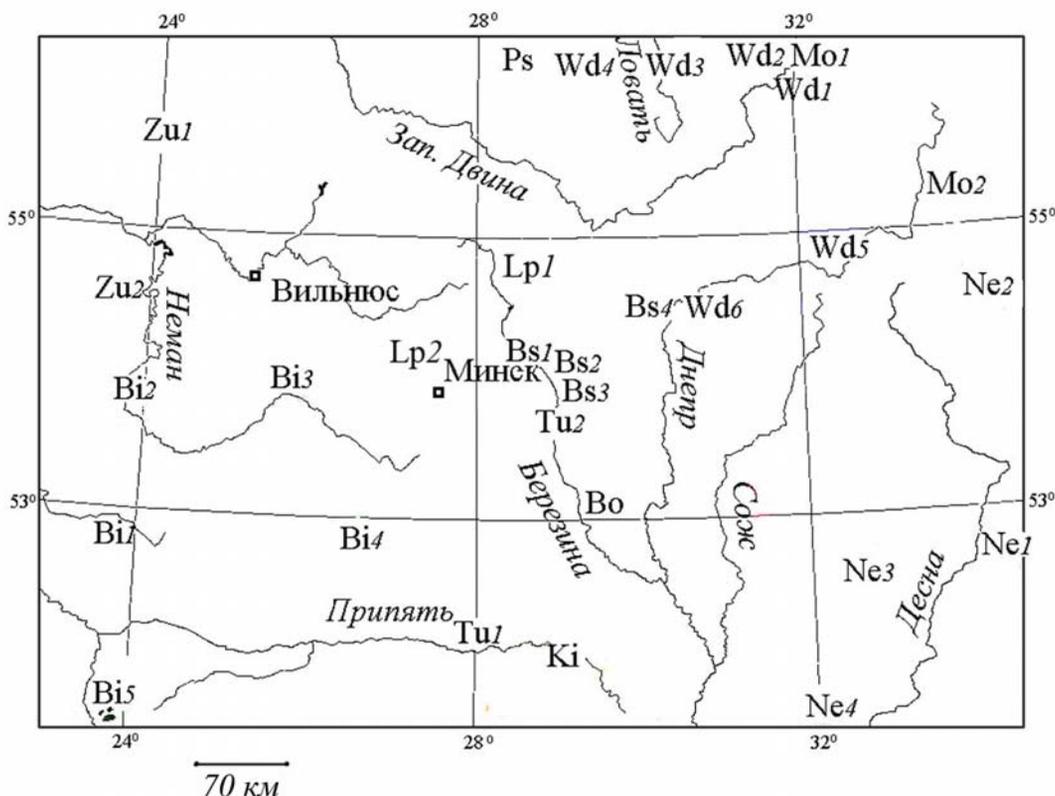


Рис. 1. Пункты отлова хромосомных рас обыкновенной бурозубки в Беларуси и на соседних территориях. Пункты обозначены общепринятыми сокращенными названиями рас: *Bi* – Białowieża, *Bo* – Бобруйск, *Bs* – Борисов, *Lp* – Лепель, *Mo* – Москва, *Ne* – Нерусса, *Ps* – Псков, *Tu* – Туров, *Wd* – Западная Двина, *Zu* – Zuvintas. Номера пунктов соответствуют таблице. Пять точек на карте: *Wd3, Bs1, Bs2, Bs3* и *Tu2* объединяют по два пункта отлова.

Распространение расы Западная Двина в западном направлении ограничивает кариологически близкая к ней раса Псков, отличающаяся от расы Западная Двина по двум диагностическим метацентриками (*gm, hk, ip, nr, oq*) (рис. 1, *Ps*) [11], а в юго-западном направлении – другая кариологически близкая к ней полиморфная раса Лепель (*g/m, hk, i/p, n/q, o/r*) [13]. (рис. 1: *Lp1*).

В бассейне Верхнего Днепра (Смоленская возв.) расстояние между ближайшими пунктами, в которых обнаружена раса Западная

Двина (г. Кардымово), раса Москва (г. Издешково) и Нерусса (г. Спас-Деминск) (*g/o, hi, kr, mn, p/q*), не превышает 150 км (таблица 1, рис. 1: *Wd5, Mo2, Ne2*) [6, 9, 12]. Поэтому не исключено, что в бассейне Днепра эти три расы, различающиеся по 3 диагностическим метацентрикам, контактируют.

Вблизи южной границы ареала расы Западная Двина, в окрестностях г. Кардымово (20 км восточнее г. Смоленска), нами обнаружен монотипный метацентрический кариотип расы Западная Двина (таблица 1, рис. 1: п. *Wd5*) [6,

18]. Однако, в популяции из окр. г. Дубровно (Горецко-Мстиславская возвышенность; 80 км юго-западнее г. Смоленска) мы обнаружили полиморфизм по трем из пяти диагностических слияний: *g/m*, *i/p*, и *q/r* (табл. 1, рис. 1 *Wd6*), а в популяции Оршанской возвышенности (г. Смоляны, вблизи г. Орша) (Табл.1, Рис.1: *Bs4*) метацентрик *ip* не был обнаружен (таблица 1, рис. 1) [6, 18]. Продолжение исследований в шести пунктах южнее Оршанской возвышенности (табл 1: *Bs1-4*, *Tu2*), в бассейне р. Бобр (левый приток Березины) также показало, что у всех обыкновенных бурозубок в этих пунктах отсутствует метацентрик *ip* [19].

Отсутствие диагностического метацентрика *ip* в группе популяций обыкновенных бурозубок, занимающих территорию в бассейне р. Бобр от г. Орша до гг Борисов и Березино (табл. 1: *Bs1-4*), позволило нам выделить их в новую хромосомную расу – Борисов: *XX/XY₁Y₂*, *af*, *bc*, *jl*, *tu*, *g/m*, *h/k*, *i*, *p*, *n/o*, *q/r* (по названию города, в окрестностях которого был впервые обнаружен акроцентрический вариант хромосом *i* и *p*) [6, 18].

Частота остальных 4 диагностических метацентриков, *gm*, *hk*, *no* и *qr*, убывает в юго-западном направлении, и в 2 пунктах окр. Березино (правый и левый берег р. Березина) все «диагностические» хромосомы, кроме *h/k*, представлены исключительно акроцентриками (таблица 1: *Tu2,3*) [18, 19].

Снижение частоты метацентриков *gm*, *hk*, *no* и *qr* в популяциях расы Борисов в юго-западном направлении указывает на гибридный характер происхождения этого полиморфизма. Нами было показано, что обыкновенные бурозубки мономорфной расы Западная Двина («метацентрическая» мономорфная раса образовавшаяся в рефугиумах Валдайского оледенения) мигрировали с севера на территорию Беларуси, занятую местными популяциями с акроцентрическими хромосомами, и в результате образовали широкую гибридную зону (приблизительно 150 км) [6, 18, 19]. В популяциях расы Борисов, встречаются кариотипы с разными комбинациями акро- и метацентрических вариантов *g/m*, *h/k*, *n/o* и *q/r*, но плечи *i* и *p* всегда присутствуют как акроцентрические хромосомы. Ранее в качестве диагностических хромосом этой расы, кроме акроцентриков *i* и *p*, были

определены также акроцентрики *q* и *r* [6, 18]. При увеличении числа проанализированных особей оказалось, что 9 из 50 бурозубок в бассейне р. Бобр – гетерозиготы по слиянию *q/r*, следовательно, только акроцентрические хромосомы *i* и *p* являются диагностическим признаком расы Борисов (табл.1: *Bs1-4*) [19].

Бурозубки с левого и правого берегов реки Березины из окр. г. Березино (расстояния между пунктами на правом и левом берегу 10 км по течению Березины) (Табл. 1: *Tu2*) были отнесены к расе Туров *XX/XY₁Y₂*, *af*, *bc*, *jl*, *tu*, *g*, *h/k*, *i*, *m*, *n*, *o*, *p*, *q*, *r*, впервые описанной А.В. Мишта (2000) в окр. г. Туров на левом берегу р. Припять (*Tu1*) [10]. В популяции расы Туров из окр. г. Березино пять из 27 особей оказались гомозиготами по акроцентрикам *h* и *k* (т.е. все 10 диагностических плеч - акроцентрики). Кариотип с гетерозиготным вариантом слияния *h/k* (т.е. идентичный первоначально описанному в бассейне р. Припять, [10]) был выявлен у 12 особей из этих точек, а 9 особей были гомозиготами по метацентрику *hk* (таблица 1: *Tu2*) [18, 19].

Кариотип с 10 парами акроцентриков *g*, *h*, *i*, *k*, *m*, *n*, *o*, *p*, *q*, *r* ($2n=28$) считается исходным для вида *S. araneus* [20, 21]. В настоящее время известны всего две расы обыкновенной бурозубки с 10 парами акроцентрических хромосом: раса Кордон, сохранившаяся в Западных Альпах, и раса Пелистер, обитающая на Балканах [22]. Судя по современному распространению акроцентрических хромосом в популяциях обыкновенной бурозубки Беларуси (табл. 1), гипотетическая «acroцентрическая» раса в плейстоцене была широко распространена на территории современной Беларуси [6, 18]. В плейстоцене, в течение трех ледниковых эпох и теплых межледниковых периодов, когда ареалы европейских видов многократно изменялись [23-25], территория Беларуси оказалась в относительно благоприятных климатических условиях [26], и там могли сохраниться популяции с исходным акроцентрическим кариотипом.

Напротив, популяции *S. araneus*, обитающие на северо-востоке Европы, во время Поздневалдайского оледенения (максимум 18-тыс л. н.) надолго оказывались изолированными в малых рефугиумах, чем, вероятно, и объясняется фиксация хромосомных перестроек в восточноевропейских популяциях и возник-

новение мономорфных хромосомных рас [7, 27, 28]. В позднеледниковье и начале голоцена (13–10 тыс. л. н.), при восстановлении лесной зоны и единого ареала обыкновенной бурозубки, популяции с акроцентрическими хромосомами вступили в контакт с «метацентрическими» расами. В результате процессов гибридизации между «метацентрическими» расами и автохтонной «acroцентрической» расой на территории Беларуси возникли популяции с различной частотой метацентрических хромосом [6, 18; 19].

Две расы, Туров и Бобруйск, распространенные на территории Беларуси, и раса Жувинтас, обитающая в Литве, характеризуются почти полностью акроцентрическими кариотипами, за исключением слияния двух плеч (*h/k* расы Туров и Жувинтас и *h/i* Бобруйск) [10, 18; наши данные]. Метацентрик *hi* у расы Бобруйск может быть следствием гибридизации с расой Нерусса (*g/o, hi, k/r, mn, p/q*), которая распространена на восточной Украине в бассейне р. Десна [10] (табл. 1: *Ne1-4*). Если это предположение верно, то гибридные популяции между расами Бобруйск и расой Нерусса (*h/i, g/o, k/r, m/n, p/q*) могут быть обнаружены к востоку от г. Бобруйск.

Кроме того, происхождение метацентрика *hi* расы Бобруйск может быть связано и с расой Киев (*g/m, h/i, k/o, n, p, q, r*) [6]. Согласно нашим последним данным, ближайшее расстояние между пунктами, в которых обнаружены представители этих рас, окр. г. Бобруйск (раса Бобруйск) и окр. г. Мозырь (раса Киев), составляет всего 125 км (рис. 1: *Bo, Ki*). Вероятно, в районе бассейна реки Березина при ее впадении в Днепр возможно выявить зону контакта трех хромосомных рас Киев (*h/i*), Нерусса (*h/i*), и Бобруйск (*h/i*).

Полиморфная раса Киев широко распространена на территории Украины [10] и обнаружена нами на юге Беларуси. Ранее среди 16 особей этой расы, отловленных в 8 пунктах на юго-западе Украины, выявлено 6 вариантов слияний *g/m* и *k/o*, но плечи *h* и *i* формировали метацентрик во всех кариотипах [10]. Однако, на правом берегу реки Припять в окрестностях г. Мозырь мы нашли двух особей расы Киев, гетерозиготных по слиянию *h/i* (табл. 1: *Ki*), что может свидетельствовать о гибридном происхождении этих бурозубок (расы Киев и Бобруйск).

Полиморфная раса Беловеж (*g/r, hn, ik, m/p, o, q*) распространена в Польше [16, 29], а также на северо-западе Украины и в районе оз. Лесное на западе Беларуси (Гродненская обл.) [10] (табл. 1, рис. 1). В популяциях этой расы выявлено 4 комбинации слияний *g/r* и *m/p* [10] (*Bi3,5*). Новая комбинация этих слияний, *g/r, m/p*, была выявлена нами в окрестностях г. Ганцевичи (табл. 1: *Bi4*). Из всех хромосомных рас известных на территории Беларуси только для расы Беловеж характерны диагностические слияния *g/r* и *h/n*, что свидетельствует об обособленности расы Беловеж от вышеперечисленных рас [6].

Как уже говорилось выше, при гибридизации мономорфных «метацентрических» рас с местными «acroцентрическими» популяциями могут быть сформированы широкие гибридные зоны [6, 18, 19]. Иная ситуация наблюдается в случае северо-восточных хромосомных рас, характеризующихся неполной гомологией метацентриков (например, *hk, hi* и *hn*), между которыми если и образуются зоны контакта и гибридизации, то очень узкие [5, 8, 14–15, 17]. Разная ширина гибридных зон при контакте популяций, различающихся по центрическим слияниям, традиционно объяснялась снижением приспособленности и фертильности гетерозигот [30]. У «простых» гетерозиготных по Робертсоновским транслокациям особей (метацентрик и два гомологичных ему акроцентрика) в мейозе I образуются триваленты, которые существенно не влияют на правильное расхождение хромосом и плодовитость, и при гибридизации «метацентрических» рас с «acroцентрическими» расами образуются широкие гибридные зоны. Напротив, у гетерозигот по разным метацентрикам (при монобрахиальной гомологии метацентриков) в мейозе образуются мультиваленты, кольца или цепочки, что приводит к образованию анеуплоидных гамет и снижению фертильности. Однако, согласно последним данным, репродуктивная изоляция между расами обыкновенной бурозубки связана не столько с цитогенетическими, сколько с этиологическими различиями хромосомных рас [31].

Зоны контакта и гибридизации между расами разного происхождения очень интересны с точки зрения изучения конкурентных отношений. Уникальная зона контакта трех

хромосомных рас Западная Двина – Селигер – Москва была нами выявлена на юге Валдайской возвышенности (Андреапольский район Тверской области, линия озер Бросно, Лучанское и Любино) [15, 17]. Область совместного обитания всех трех рас была очень узкой даже в условиях синтопии и при отсутствии каких-либо географических преград. Строго парапатрическое расселение рас Западная Двина и Москва может быть связано с напряженными конкурентными отношениями между этими расами, например избеганием контактов и разделением экологических ниш [17].

По особенностям расселения и гибридизации различных хромосомных рас обыкновенной бурозубки можно судить о начальных этапах изоляции популяций. В этом отношении зона контакта трех хромосомных рас представляется перспективной моделью для исследования процессов возникновения видовой изоляции.

В южной части территории Беларуси (бассейн р. Припять), возможно, находятся зоны контакта (не исключено также и гибридизации) хромосомных рас с различными по происхождению метацентриками неполной гомологии: *hn*, *hk* и *hi*. Согласно новым нашим данным, эти расы: Лепель (*g/m, hk, i/p, n/q, o/r*) в окр. Минска, раса Беловеж (*g/r, hn, ik, m/p*) в окр. г. Ганцевичи, Туров (*h/k*) в окр. гг. Туров и Березино, раса Киев (*g/m, h/i, k/o*) в окр. г. Мозырь и раса Бобруйск (*h/i*) в окр. г. Бобруйск удалены друг от друга на расстояние от 100 до 200 км (рис. 1: *Lp2, Vi4, Tu1-2, Ki, Vo*). Особенно интересно найти контактную зону трех хромосомных рас: Беловеж (*hn*), Туров (*h/k*) и мигрирующей с юга расы Киев (*hi*), между гг. Ганцевичи и Туров (расстояние немногим более 100 км). На примере таких контактных зон можно исследовать становление репродуктивной изоляции между географически разобщенными формами.

Таблица 1

Пункты отлова и диагностические хромосомы обыкновенных бурозубок в Беларуси и на сопредельных территориях

№№ пунктов	Хромосомная раса, пункты отлова	Число особей	2na	Диагностические хромосомы	Ссылка
	2	4	5	6	7
Ps	Псков (Ps)			<i>gm, hk, ip, nr, oq</i>	
Ps	г. Себеж, Россия, Псковская обл.	2	18	<i>gm, hk, ip, nr, oq</i>	[11]
	Москва (Mo)			<i>gm, hi, kr, no, pq</i>	
Mo1	пос. Волок, Россия, Тверская обл., верховья р. Западная Двина (р. Волкота)	25	18	<i>gm, hi, kr, no, pq</i>	[14]
Mo2	пос. Издешково, Россия, Смоленская обл.	3	18	<i>gm, hi, kr, no, pq</i>	[12]
	Западная Двина (Wd)			<i>gm, hk, ip, no, qr</i>	
Wd1	г. Западная Двина, Россия, Тверская обл.	3	18	<i>gm, hk, ip, no, qr</i>	[13]
Wd2	пос. Волок, Россия, Тверская обл., верховья р. Западная Двина, (р. Волкота)	8	18	<i>gm, hk, ip, no, qr</i>	[14]
Wd3	окр. г. Великие Луки, Россия, Псковская обл., р. Ольшанка	4	18	<i>gm, hk, ip, no, qr</i>	**
Wd3	окр. г. Великие Луки (д. Воротково), Псковская обл.	2	18	<i>gm, hk, ip, no, qr</i>	
Wd4	г. Пустошка, Россия, Псковская обл.	3	18	<i>gm, hk, ip, no, qr</i>	**

Wd5	г. Кардымово (д. Бережняны), Россия, Смоленская обл.	2	18	<i>gm, hk, ip, no, qr</i>	[6]
Wd6	г. Дубровно (д. Русаны), Беларусь, Витебская обл.	2	19	<i>g/m, hk, ip, no, qr</i>	[6]
		1	21	<i>g/m, hk, i/p, no, q/r</i>	[6]
	Борисов (Bs)			<i>g/m, h/k, i, p, n/o, q/ r</i>	
Bs4	г. Смоляны, Беларусь, Витебская обл.	2	22	<i>g/m, hk, i, p, no, q/r</i>	[6]
Bs1	г. Борисов (д. Новая Мётча), Беларусь, Минская обл.	6	23	<i>gm, hk, i, p, n/o, q, r</i>	[18]
Bs1	д. Велятичи, Минская обл.	1	22	<i>gm, hk, i, p, n/o, q/r</i>	[18]
		1	23	<i>gm, hk, i, p, n/o, q, r</i>	
Bs2	д. Выдрица, Беларусь, Минская обл.	1	22	<i>gm, hk, i, p, n/o, q/r</i>	[18]
		1	23	<i>gm, hk, i, p, n/o, q, r</i>	
		2	24	<i>gm, hk, i, p, n, o, q, r</i>	
Bs2	г. Ухвала (д. Малые Вязки), Беларусь, Минская обл.	5	22	<i>gm, hk, i, p, n/o, q/r</i>	[18]
		4	23	<i>gm, hk, i, p, n/o, q, r</i>	
		4	24	<i>gm, hk, i, p, n, o, q, r</i>	
		4	24	<i>g/m, hk, i, p, n/o, q, r</i>	
		1	24	<i>gm, h/k, i, p, n/o, q, r</i>	
		1	25	<i>g/m, h/k, i, p, n/o, q, r</i>	
		1	26	<i>g/m, h/k, i, p, n, o, q, r</i>	
		1	24	<i>g, m, hk, i, p, no, q, r</i>	
		6	25	<i>g/m, hk, i, p, n, o, q, r</i>	
Bs3	д. Михевичи, Беларусь, Минская обл.	2	25	<i>gm, h/k, i, p, n, o, q, r</i>	[18]
		2	25	<i>g/m, hk, i, p, n, o, q, r</i>	
		1	26	<i>g, m, hk, i, p, n, o, q, r</i>	
Bs3	д. Лесковичи, Беларусь, Минская обл.	1	24	<i>gm, hk, i, p, n, o, q, r</i>	[18]
		1	26	<i>g, m, hk, i, p, n, o, q, r</i>	
	Туров (Tu)			<i>g, h/k, i, m, n, o, p, q, r</i>	
Tu1	г. Туров, Беларусь, Гомельская обл.	1	27	<i>g, h/k, i, m, n, o, p, q, r</i>	[10]
Tu2	г. Березино, Беларусь, Минская обл., левый берег р. Березина	1	25	<i>g, hk, i, m, n, o, p, q, r</i>	[18]
		6	26	<i>g, hk, i, m, n, o, p, q, r</i>	
		8	27	<i>g, h/k, i, m, n, o, p, q, r</i>	
		4	28	<i>g, h, k, i, m, n, o, p, q, r</i>	
Tu2	г. Березино, Беларусь, Минская обл., правый берег р. Березина	3	26	<i>g, hk, i, m, n, o, p, q, r</i>	
		6	27	<i>g, h/k, i, m, n, o, p, q, r</i>	
		1	28	<i>g, h, k, i, m, p, n, o, q, r</i>	
	Бобруйск (Bo)			<i>g, h/i, k, m, n, o, p, q, r</i>	
Bo	г. Бобруйск, Беларусь, Гомельская обл.	1	27	<i>g, h/i, k, m, n, o, p, q, r</i>	[10]
	Киев			<i>g/m, h/i, k/o, n, p, q, r</i>	
Ki	г. Мозырь, Беларусь, Гомельская обл., правый берег р. Припять	1	25	<i>g/m, h/i, k/o, n, p, q, r</i>	**
		1		<i>g, h/i, k/o, m, n, p, q, r</i>	
	Нерусса (Ne)			<i>go, hi, kr, mn, pq</i>	
Ne1	г. Нерусса, Россия, Брянская обл., р. Нерусса	2	18	<i>go, hi, kr, mn, pq</i>	[9]
Ne2	г. Спас-Деменск, Россия, Калужская обл.	6	18	<i>go, hi, kr, mn, pq</i>	[9]
Ne3	г. Новозыбков, Россия, Брянская обл.	3	21-24	<i>g/o, hi, k/r, mn, p, q</i>	[9]
Ne4	г. Березна, Украина, Черниговская обл.	1	18	<i>go, hi, kr, mn, pq</i>	[10]
	Жувинтас (Zu)			<i>g, hk, i, m/n, o, p, q, r</i>	
Zu1	г. Крекенава, Литва	2	26	<i>g, hk, i, m, n, o, p, q, r</i>	[10]
Zu2	г. Жувинтас, Литва	1	25	<i>g, hk, i, m/n, o, p, q, r</i>	[10]
		4		<i>g, hk, i, m, n, o, p, q, r</i>	

	Беловеж (Ві)			g/r, h/n, ik, m/p, o, q	
Vi1	г. Беловеж, Польша	2		<i>g/r, hn, ik, m/p, o, q</i>	[16]
Vi2	г. Гродно, Беларусь, Гродненская обл.	1		<i>gr; hn, ik, m, p, o, q</i>	**
		1		<i>g/r, hn, ik, m, p, o, q</i>	
Vi3	пос. Лесное озеро, Беларусь, Гродненская обл.	2	22	<i>gr; hn, ik, m, p, o, q</i>	[10]
		2		<i>g/r, hn, ik, m, p, o, q</i>	
		1		<i>g, r, hn, ik, m/p, o, q</i>	
Vi4	г. Ганцевичи, Беларусь, Брестская обл.	1		<i>g/r; hn, ik, m/p, o, q</i>	**
		1		<i>g, r, hn, ik, m/p, o, q</i>	
Vi5	пос. Шацкие озера, Украина, Луцкая обл.	1	21	<i>gr; hn, ik, m/p, o, q</i>	[10]
				<i>gm, hk, ip, nq, or</i>	
Lp1	г. Лепель, Беларусь, Витебская обл.	1	19	<i>gm, hk, ip, nq, o/r</i>	[9]
Lp2	г. Бесяды, Беларусь, Минская обл.	1	22	<i>g/m, hk, i/p, n/q, o/r</i>	[10]
		1	23	<i>g/m, hk, i/p, n/q, o, r</i>	

Примечания. В скобках – сокращенное международное название расы. Гетерозиготность пары хромосом показана косой черточкой (/)

Ссылки: [6] – Орлов, Борисов, 2009; [9] - Bulatova et al., 2000; [10] - Mishta et al., 2000; [11] - Зайцев, Булатова, 1999; [12] - Kozlovsky et al., 2000; [13] - Булатова и др., 2002; [14] - Orlov, Borisov, 2007; [16] - Fredga, Nawrin, 1977; [18] – Борисов и др., 2009;

** - данные настоящего сообщения

Заключение

Все исследованные на территории Беларуси популяции обыкновенной бурозубки полиморфны по Робертсоновским транслокациям в отличие от популяций, распространенных севернее и восточнее, которые преимущественно мономорфны. Фиксацию хромосомных перестроек в восточноевропейских популяциях и возникновение мономорфных форм можно объяснить тем, что в ледниковые эпохи они чаще и на более длительное время оказывались изолированными в малых рефугиумах.

Широкое распространение полиморфных хромосомных рас в современных популяциях обыкновенной бурозубки на территории Беларуси, по-видимому, связано с существованием на этой территории в позднем плейстоцене хромосомной расы с 10 парами акроцентрических хромосом (*g, h, i, k, m, n, o, p, q, r*). В позднеледниковье и начале голоцена (13–10 тыс. л. н.) популяции с акроцентрическими

хромосомами, обитающие на территории Беларуси вступили в контакт с расами, в кариотипах которых преобладали метацентрические хромосомы. В результате гибридизации между «метацентрическим» расами и автохтонной «acroцентрической» расой возникли популяции с различной частотой метацентрических хромосом.

Изучение разных по происхождению полиморфных популяций обыкновенной бурозубки на территории Беларуси позволяет проследить уникальный процесс хромосомной микроэволюции данного вида.

Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 09-04-00530а, 09-04-00130а), Программы ФИ Президиума РАН «Биологическое разнообразие» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (2009-1.1-141-063-021).

Список использованных источников

1. Борисов, Ю.М. Популяционная цитогенетика грызунов (Mammalia. Rodentia) / Ю.М. Борисов // Итоги науки и техники. Общая генетика. Москва: ВИНТИ. – 1981. – Т. 7. – С. 79–152.
2. Rieseberg, L. H. Chromosomal rearrangements and speciation / L.H. Rieseberg // Trends in ecology and evolution. – 2001. – Vol. 16, – № 7. – P. 351–357.
3. Searle, J. B. Nomenclature for the chromosomes of the common shrew (*Sorex araneus*) / J. B. Searle, S. Fedyk, K. Fredga [et al.] // Mém. Soc. Sc. Natur. – 1991. – Vol. 19. – P. 13–22.
4. Hausser, J. Definition and nomenclature

- of the chromosome races of *Sorex araneus* / J. Hausser, S. Fedyk, K. Fredga [et al.] // *Folia Zool.* – 1994. – Vol. 43, Suppl. 1. – P. 1–9.
5. Щипанов, Н.А. Обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus*) – модельный вид эколого–эволюционных исследований / Н.А. Щипанов, Н.Ш. Булатова [и др.] // *Зоол. журн.* – 2009. – Т. 88, № 6. – С. 1–15.
 6. Орлов, В.Н. Филогенетические связи обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus* L., Insectivora) Белоруссии по кариологическим данным / В.Н. Орлов, Ю.М. Борисов // *Зоол. журн.* – 2009. – Т. 88, № 12. – С. 1506–1514.
 7. Орлов, В.Н. О роли ледниковых эпох в формировании хромосомного полиморфизма обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. (Insectivora, Mammalia) / В.Н. Орлов, А.И. Козловский // *Докл. АН.* – 2002. – Т. 386. – С. 423–426.
 8. Борисов, Ю.М. Контакты хромосомных рас обыкновенной бурозубки, *Sorex araneus* L. (INSECTIVORA), на краевых образованиях вепсовской стадии Валдайского ледника / Ю.М. Борисов, А.И. Козловский [и др.] // *Сибирский экологический журнал.* – 2008. – № 5. – С. 763–771.
 9. Bulatova, N.Sh. The diversity of chromosome races in *Sorex araneus* from European Russia / N.Sh. Bulatova, J.B. Searle [et al.] // *Acta Theriol.* – 2000. – Vol. 45, Suppl. 1. – P. 33–46.
 10. Mishta, A.V. Karyotypic variation of the common shrew *Sorex araneus* in Belarus, Estonia, Latvia, Lithuania and Ukraine / A.V. Mishta [et al.] // *Acta Theriol.* – 2000. – Vol. 45, Suppl. 1. – P. 47–58.
 11. Зайцев, М.В. Бурозубки двух западных районов Псковской области и их хромосомные диагнозы (*Sorex*, *Soricidae*, *Insectivora*) / М.В. Зайцев, Н.Ш. Булатова // *Зоол. журн.* – 1999. – Т. 78. Вып. 5. – С. 601–605.
 12. Kozlovsky, A.I. Chromosome studies on common shrew from northern and central parts of European Russia / Kozlovsky A.I., Orlov V.N. [et al.] // *Acta Theriol.* – 2000. – Vol. 45, Suppl. 1. – P. 27–31.
 13. Булатова, Н.Ш. Внутривидовые филогенетические связи у *Sorex araneus* L.: южнобалтийская подгруппа хромосомных рас / Н.Ш. Булатова [и др.] // *Генетика.* – 2002. – Т. 38. – № 1. – С. 79–85.
 14. Orlov, V.N. Chromosome races of the common shrew *Sorex araneus* L. (Mammalia: Insectivora) from the south part of Valdai Heights / V. N. Orlov, Yu.M. Borisov // *Comparative Cytogenetics.* – 2007. – Vol. 1, № 2. – P. 101–106.
 15. Борисов, Ю.М. Зоны контакта и места совместного обитания трех хромосомных рас *Sorex araneus* L. (MAMMALIA) на юге Валдайской возвышенности // Ю.М. Борисов, А.А. Ковалева [и др.] // *Доклады РАН.* – 2009. – Т. 428, № 2. – С. 275–277.
 16. Fredga K. Karyotype variability in *Sorex araneus* L. (Insectivora, Mammalia) / K. Fredga, J. Nawrin, 1977 // *Chromosomes today.* – 1977. – Vol. 6. – P. 153–161.
 17. Орлов, В.Н. Особенности зоны контакта трех хромосомных рас обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. (Mammalia) как показатель конкуренции популяций / В.Н. Орлов, Ю.М. Борисов [и др.] // *Экология.* – 2010. – № 6. – С. 459–463.
 18. Борисов, Ю.М. Гибридное происхождение хромосомного полиморфизма популяций обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* (Mammalia) в бассейне Днепра / Ю.М. Борисов, А.А. Ковалева [и др.] // *Доклады РАН.* – 2009. – Т. 429, – № 4. – С. 561–564.
 19. Borisov, Yu.M. 2010. A wide hybrid zone of chromosome races of the common shrew, *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 (Mammalia) between the Dnieper and Berezina rivers (Belarus) / Yu.M. Borisov [et al.] // *Comparative Cytogenetics.* – 2010. – Vol. 3, – N 2. – P. (in press).
 20. Wójcik, J.M. The chromosome complement of *Sorex granaries* – the ancestral karyotype of the common shrew (*Sorex araneus*)? / J. Wójcik, J.B. Searl // *Heredity.* – 1988. – Vol. 61. – P. 225–229.
 21. Volobouev, V.T. Mechanisms of chromosomal evolution in three European species of the *Sorex araneus*–arcticus group (Insectivora: Soricidae) / V.T. Volobouev, F. Catzefflis // *Zeits. fur Zoologische Syst. Evolution.* – 1989. – Vol. 27. – P. 252–262.
 22. Zima, J. The list of the chromosome races of the common shrew (*Sorex araneus*) / J. Zima, S. Fedyk [et al.] // *Hereditas.* – 1996. – Vol. 125. – P. 97–107.
 23. Hewitt, G.M. Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation / G.M. Hewitt // *Biol. J. Linn. Soc.* –

1996. – Vol. 58. – P. 247–276.

24. Bilton, D.T. Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than the source for northwards postglacial colonization / D.T. Bilton, P.M. Mirol [et al.] // Proc. Royal Soc. London. – 1998. – В. – Vol. 265. – P. 1219–1226.

25. Deffontaine, V. Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) / V. Deffontaine, R. Libois // Molecular Ecology. – 2005. – Vol. 14. – P. 1727–1739.

26. Еловичева, Я.К. Палинология позднеледниковья и голоцена Белоруссии / Я.К. Еловичева. – Минск: Наука и техника, – 1993. – 94 с.

27. Орлов, В.Н. Эндемизм хромосомных рас обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. и возможность сохранения рефугиумов в области покровного оледенения Поздневалдайской эпохи / В.Н. Орлов, А.И. Козловский [и др.] //

Докл. АН. – 2007. – Т. 416, – № 6. – С. 1–4.

28. Orlov, V.N. Postglacial recolonisation of European Russia by the common shrew *Sorex araneus* / V.N. Orlov, A.I. Kozlovsky [et al.] // Russian J. Theriology. – 2007. – Vol. 6, – № 1. – P. 97–104.

29. Wójcik, J. 1993. Chromosome races of the common shrew *Sorex araneus* in Poland: a model of karyotype evolution J.M. Wójcik // Acta Theriologica. – 1993. – Vol. 38. – P. 315–338.

30. Searle, J. B. Chromosomal evolution: the case of *Sorex araneus* / J.B. Searl, J.M. Wójcik // Evolution of shrews. – Białowieża: Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences. – 1998. – P. 219–268.

31. Щипанов, Н.А. Распределение обыкновенный бурозубок (*Sorex araneus* L.) двух хромосомных рас в зоне интерградации. Может ли изменение типа расселения поддерживать независимость генных частот / Н.А. Щипанов [и др.] // Генетика. – 2008. – Т. 44, – № 6. – С. 734–745.

Дата поступления статьи 28 ноября 2010 г.

ПОЛИМОРФИЗМ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ЛОКУСОВ ЯЧМЕНЯ ИЗ ЦЕНТРОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ

¹ ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
Российская Федерация, 119991, г. Москва, ул. Губкина, 3

Введение

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) – одна из важнейших зерновых культур с длительной историей культивирования. Одомашнивание, а также современная селекция привели к постепенному сужению генетического разнообразия используемых представителей рода *Hordeum*. Даже за последние 100 лет многие исследователи отмечают существенное снижение генетического разнообразия у культурного ячменя [1]. Современные сорта в значительной степени генетически сходны и, следовательно, все они могут быть подвержены влиянию определенных патогенов и неблагоприятных условий окружающей среды [2].

Процессы окультуривания и селекционная деятельность человека сопровождаются снижением генетического разнообразия не только ядерных, но еще в большей степени цитоплазматических геномов, которое некоторые исследователи называют драматичным [6]. В настоящее время широко изучается изменчивость хлоропластных (хп) геномов различных растений, в том числе и ячменя [3, 4, 5]. Снижение цитоплазматического генетического разнообразия в процессе окультуривания и дальнейшей строгой селекции агрономически важных признаков предполагает введение в культуру новых или редких плазматипов. Вполне вероятно, что уникальные по хпДНК формы могут быть использованы как дополнительные источники изменчивости.

Наряду с селекционными сортами и диким *Hordeum vulgare ssp. spontaneum* (*H. v. ssp. spontaneum*), стародавние сорта (сорта народной селекции) ячменя входят в так называемый первичный генпул культурного ячменя

Hordeum vulgare ssp. vulgare (*H. v. ssp. vulgare*) и являются потенциальной базой увеличения генетического разнообразия для селекции [7]. Стародавние сорта ячменя из центров происхождения обладают значительно большим генетическим разнообразием, чем культурные сорта, часто не несут нежелательных для селекционеров «диких» генов и напротив являются незаменимыми источниками полезных генов для селекции ячменя.

Помимо поиска редких и ценных генов, изучение изменчивости ячменя из предполагаемых центров происхождения представляет интерес в связи с теорией происхождения культурного ячменя. В настоящее время в литературе преимущественно обсуждаются гипотезы происхождения культурного ячменя в «Дуге Плодородия», проходящей через территории Израиля, Палестины, Ливана, Западной Сирии, юго-востоку Турции и горам Загроса в Иране и Ираке [8, 9, 10], Северной Африки (Марокко) [11, 12], Тибета [13]. Дискутируется вопрос о происхождении ячменя из Эфиопии [14, 5], однако данное предположение подвергается сомнению вследствие отсутствия там диких предков *Hordeum vulgare*. Возможно, корни эфиопских ячменей могут лежать в Междуречье («Плодородный Полумесяц») [15, 16].

Существуют предположения, что ячмень был введен в культуру в различных местах независимо. Molina-Cano J.L. et al. [3], исследуя полиморфизм микросателлитных локусов хлоропластной ДНК ячменя, выделили два независимых центра происхождения в Эфиопии и Западном Средиземноморье. Работы Saisho

D. and Purugganan M. D. [17], Morrell P. L. и Clegg M. T [18] подтверждают предположение о том, что ячмень был окультурен как минимум дважды. Таким образом, общепринятой теории о происхождение культурного ячменя в настоящее время не существует.

В связи с этим, исследование изменчивости хлоропластных геномов стародавних сортов ячменя из предполагаемых центров происхождения – Северной Африки, Ближнего Востока, Эфиопии, Йемена – будет способствовать

не только поиску новых и редких плазматипов, но и прояснению вопроса о происхождении культурного ячменя.

Данное исследование проведено с использованием микросателлитных маркеров к хлоропластному геному, которые широко используются в популяционной генетике, эффективны для выявления гибридизации и интрогрессии [19], анализа генетического разнообразия [20] и филогеографии растительных популяций [21].

Материалы и методы

Материалом для исследования являлись 565 образцов ячменя из предполагаемых центров происхождения (представляющие собой более 80 популяций местных стародавних сортов культурного ячменя *H. v. ssp. vulgare (landrases)* из различных точек сбора в местах исторического земледелия). Образцы, использованные в данной работе, были

получены из Международного центра сельскохозяйственных исследований в засушливых регионах (ICARDA-ИКАРДА) (г. Алеппо, Сирия), а также из Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР, Санкт-Петербург). Распределение образцов ячменя по странам и регионам представлено в таблице 1.

Таблица 1

Образцы ячменя из предполагаемых центров происхождения

Регион	Страна происхождения	Количество образцов	Общее количество образцов
Северная Африка	Алжир	24	84
	Египет	60	
Ближний Восток	Израиль	31	291
	Иордания	36	
	Ирак	82	
	Палестина	47	
	Сирия	95	
Эфиопия (Абиссиния)	Эфиопия	128	128
Южная Аравия	Йемен	62	62
Итого			565

Тотальную ДНК выделяли из индивидуальных 6-7 дневных проростков по стандартной методике [22].

Для изучения изменчивости микросателлитных последовательностей использовали SSR-маркеры к хлоропластной

ДНК ячменя, демонстрирующие высокий уровень полиморфизма у данной культуры [6]: *hvcptrnS2* (3' район *trnS* гена), *hvcptrnS1* (3' район *trnS* гена), *hvcprpA* (3' район *rpoA* гена), *hvcptrnLF* (межгенная область *trnL/trnF*) (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика праймеров, использованных для изучения оргanelльных геномов

Название	Область хпДНК	Праймер (5' → 3')	Тип повтора	Индекс полиморфизма H
hvcptrnS1	3' trnS район	F CTTTAGCGGGCATTTCATA R ATGGTGGATTTGATAAGAACCC	(A) ₇ CGC (T) ₁₃	0,44
hvcptrnS2	3' trnS район	F CAACTCCTTTGCGCTACACA R ACCCCTTTTTTCCCATTC	(T) ₁₀	0,5
hvcprpA	5' rpoA район	F CTCTCGTTTTAAATCCATTGCA R TGATCCATTCGCGAAAATA	(T) ₈ (CTT) ₃	0
hvcptrnLF	Межгенный район trnL- trnF	F GAGTATCGGCAAGAAATCTTGG R TCAAAATTTGAAAGGGGGG	(C) ₉	0,49

Все маркеры были мечены флуоресцентной меткой Cy-5.

Специфическую ПЦР проводили в объеме 10 µL, содержащем 1x ПЦР буфер (60 mM Tris – HCl, 25 mM KCl, 10mM 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100) (СибЭнзим), 1.5 mM Mg-Cl₂, 200 µM dNTPs, 4 pmol прямого праймера, 4 pmol обратного праймера, 0.5U *Taq* полимеразы (СибЭнзим), 50-100 ng геномной ДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems) согласно Provan et al. [6].

Продукты реакции амплификации с Cy-5 мечеными маркерами разделяли в 6-8% полиакриламидном денатурирующем геле в 1x трис – боратном буфере (0,09 M Tris – борат, 0,01 M ЭДТА) в секвенаторе ALF Express. Размеры полученных фрагментов вычислены с

использованием программы ALFwin Fragment Analyser версии 1.02 сравнением внутренних стандартов размеров, которые были добавлены в каждую лунку геля.

Расчеты и построения графиков проводили с использованием возможностей Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Office Access 2003, Statistica версия 6, Arlequin версия 3.1. Для оценки информативности комбинаций праймеров был использован коэффициент: $H = (n/(n-1))(1 - \sum p_i^2)$, где p_i – частота i -го аллельного варианта, n – число образцов в анализируемой выборке. Для оценки несходства между популяциями из различных регионов использовали Евклидово расстояние, кластерный анализ проводили по методу наиболее удаленных соседей (алгоритм Complete-link).

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ размеров микросателлитных локусов хлоропластной ДНК анализируемых образцов обнаружил высокий уровень полиморфизма для 3 локусов из 4 исследованных, в то время как для маркера *hvcprpA* полиморфизм выявлен не был. Индекс полиморфизма для маркеров *hvcptrnS1*, *hvcptrnS2* и *hvcptrnLF* равен 0,44; 0,5 и 0,49 соответственно (таблица 2).

Для маркеров *hvcptrnLF*, *hvcptrnS2* наблюдалось по 2 аллеля на локус, для *hvcptrnS1* – 3

аллеля. Аллели достаточно хорошо различались между собой по электрофоретической подвижности фрагментов. Амплифицированные фрагменты ДНК имели размеры от 100 п.н. до 130 п.н., в зависимости от праймера (таблица 3). Различия по размеру между фрагментами амплифицированной ДНК для *hvcptrnLF* и *hvcptrnS2* составили 1 п.н., для *hvcprpA* 2 п.н., для *hvcptrnS1* – до 5 п.н. Пример электрофореграммы с маркером *hvcptrnLF* представлен на рисунке 1.

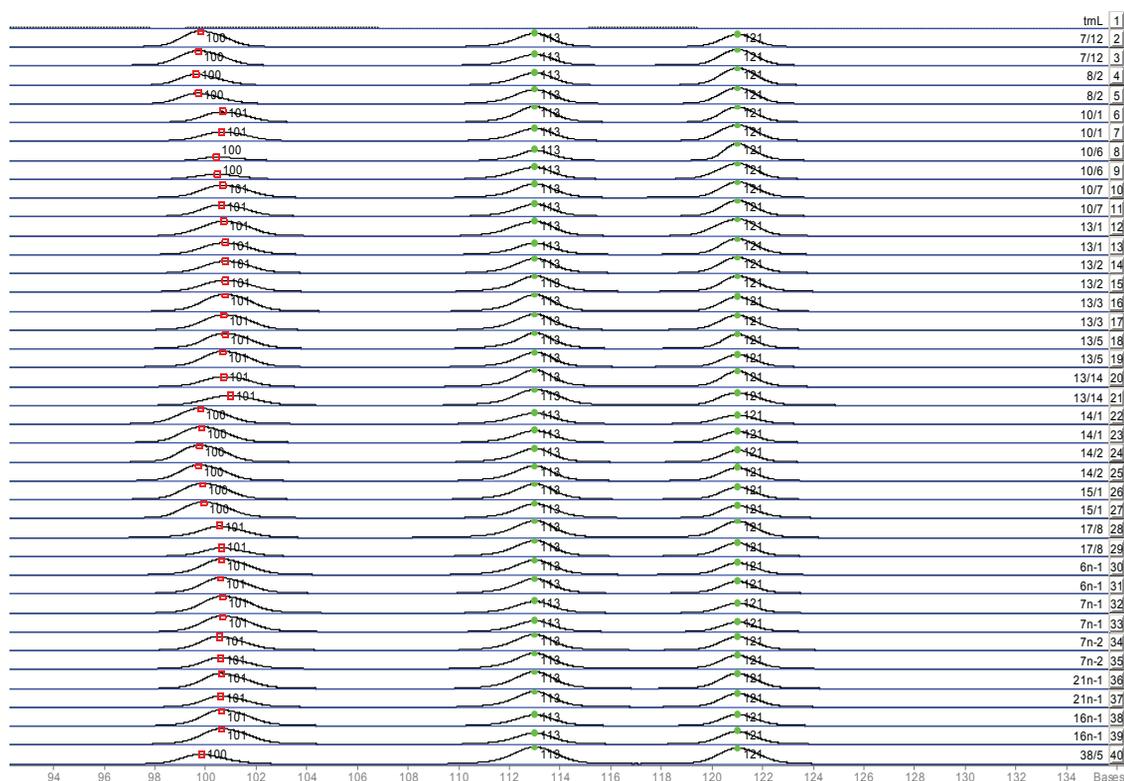


Рис. 1. Пример электрофореграммы в 6%-ном полиакриламидном геле для маркера *hvcptrnLF*.

Комбинация полученных размеров фрагментов позволила выделить 10 плазматипов, представленных в таблице 3, а их частоты в исследованной выборке представлены на рисунке 2.

Таблица 3

Плазматипы, выявленные среди стародавних сортов ячменя

Название гаплотипа	Размер фрагмента по <i>hvcptrnS1</i> , п.н.	Размер фрагмента по <i>hvcptrnS2</i> п.н.	Размер фрагмента по <i>hvcptrnLF</i> п.н.	Размер фрагмента по <i>hvcprpA</i> п.н.
A	126	112	100	122
B	130	113	101	122
C	125	112	100	122
D	126	112	101	122
E	126	113	101	122
F	130	113	100	122
G	130	112	101	122
I	125	112	101	122
J	130	112	100	122
K	126	113	100	122

Распределение всех гаплотипов по регионам представлено в таблице 4.

Таблица 4

Распределение исследованных образцов из различных регионов по гаплотипам

Регион	Страна	Гаплотип										Всего исследовано образцов в стране	Всего исследовано образцов в регионе
		A	B	C	D	E	F	G	I	J	K		
Северная Африка	Алжир	-	24	-	-	-	-	-	-	-	-	24	84
	Египет	-	39	-	-	-	15	1	-	5	-	60	
Ближний Восток	Израиль	-	31	-	-	-	-	-	-	-	-	31	291
	Иордания	-	7	-	-	-	7	17	-	5	-	36	
	Ирак	31	14	-	10	1	9	14	-	3	-	82	
	Палестина	-	19	3	-	-	24	-	1	-	-	47	
	Сирия	-	46	-	-	1	6	27	-	15	-	95	
Южная Аравия	Йемен	25	25	3	6	-	1	-	1	1	-	62	62
Эфиопия	Эфиопия	17	33	54	1	-	4	12	1	2	2	128	128
	Всего каждого гаплотипа в коллекции	74	232	60	17	2	63	77	3	32	2	565	565

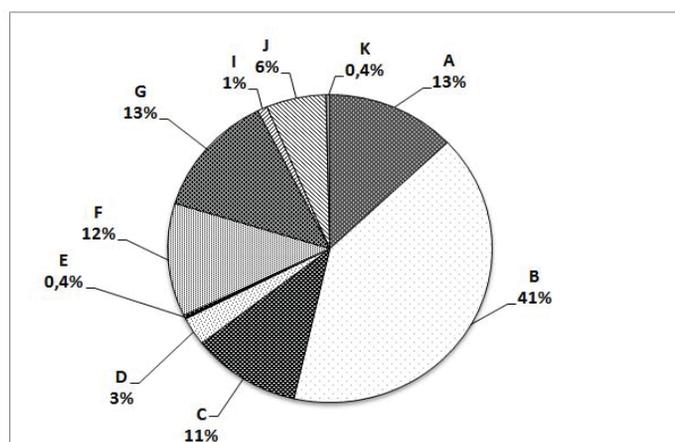


Рис. 2. Частоты гаплотипов, выявленные в стародавних сортах ячменя.

Таким образом, использование микросателлитных маркеров позволило выделить основные (A, B, C, F, G) и редкие (E, I, K) гаплотипы. Как видно из рисунка 2, наиболее часто встречающимся оказался тип B, его доля в целом составила 41%, варьируя от 17% в Ираке до 100% в Алжире и Израиле.

Как видно из таблицы 4, уровень генетического разнообразия в Северной Африке наименьший по сравнению с другими регионами. Так, в образцах из Египта выявлено только 4 гаплотипа с явным преобладанием гаплотипа

B, а в Алжире только этот гаплотип присутствовал у всех исследованных образцов. По сравнению с Северной Африкой, в Южной Аравии и на Ближнем Востоке уровень генетического разнообразия хлоропластных геномов выше: в Йемене (Южная Аравия) выявлено 7 гаплотипов, в Ираке, Сирии, Иордании и Палестине (Ближний Восток) - 7, 5, 4 и 4 гаплотипа соответственно, за исключением Израиля, где был обнаружен только один гаплотип. Наибольший уровень разнообразия наблюдался в Эфиопии, где выявлено 9 гаплотипов.

Результаты нашего исследования указывают на значительно более широкий спектр изменчивости хлоропластных геномов стародавних сортов ячменя по сравнению с современными. Так, ранее нами были исследованы по семи микросателлитным локусам 67 образцов культурного ячменя из 19 стран, из которых 24 сорта ячменя, возделываемых в Беларуси, 43 образца *H. v. ssp. vulgare* из коллекции ВИР. В результате были выделены только три гаплотипа. Редкие типы хлоропластной ДНК представлены пятью образцами, причем большинство культурных сортов относятся к одному общему гаплотипу В, сорта Роланд (Швеция) и Оболонь (Украина) – к типу F, сорта Brock (Канада), Ранний 1 (Россия), Wollamo Sadado (Эфиопия) – к типу С [23].

Такой низкий уровень генетического разнообразия хлоропластных геномов показан также для ряда культурных растений [6, 24, 25].

Provan J., et al. [6], исследуя полиморфизм хлоропластных геномов у диких и культурных ячменей, представленных 31 образцами диких

H. v. ssp. spontaneum и 226 культурными *H. v. ssp. vulgare*, выделили 11 гаплотипов с помощью микросателлитных маркеров *hvcptrnS2*, *hvcptrnS1*, *hvcprpA*, *hvcptrnLF*. Все эти гаплотипы найдены у диких *H. v. ssp. spontaneum*, у стародавних сортов выделено два гаплотипа G и С, соответствующие нашим типам В и F. Два данных гаплотипа также найдены у культурных сортов, исследованных Molina-Cano J.L. et al. [3]. Все современные сорта по Provan J., et al. [6], относились к типу G (тип В согласно нашей номенклатуре).

Выявленный нами спектр изменчивости хлоропластных геномов у стародавних сортов шире, чем указывает Provan J., et al. [6]. Помимо гаплотипов В и F, нами выявлены еще типы А и G, встречающиеся только у диких ячменей (соответствуют F и H типам по Provan J. et al. [6]., а гаплотипы D, E, I, J и K обнаружены нами впервые.

На основе полученных результатов и ранее опубликованных данных [23] был проведен кластерный анализ (рис. 4).

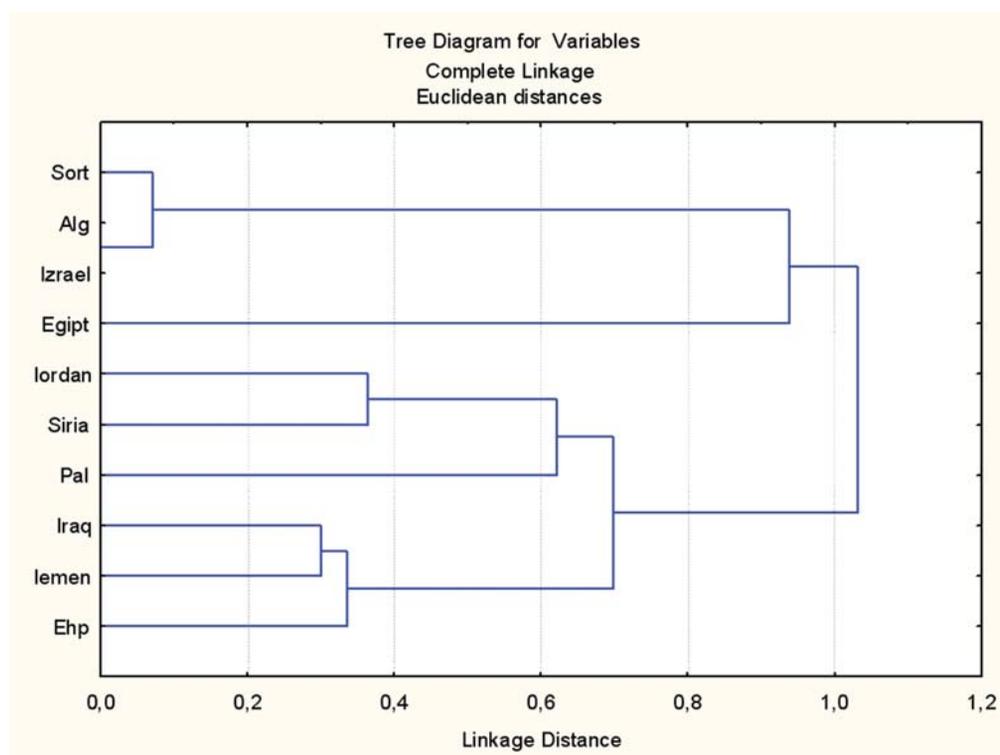


Рис. 4. Кластерный анализ частот гаплотипов в популяциях стародавних и селекционных сортов ячменя.

Обозначения: Sort – современные сорта, Alg – Алжир, Izrael – Израиль, Egipt – Египет, Jordan – Иордания, Siria – Сирия, Pal – Палестина, Iraq – Ирак, Iemen – Йемен, Ehp – Эфиопия.

Из полученной дендрограммы видно, что популяции из различных стран распределились на три кластера. Первый кластер составили популяции из Алжира, Израиля и Египта, сюда же попадают все культурные сорта. Образцы из Иордании, Сирии и Палестины (Ближний Восток) объединились во вторую группу. В третий кластер вошли популяции из Ирака, Йемена и Эфиопии.

Сходные результаты были получены Поморцевым А.А. и др. [26], изучавшими распределение аллелей трех локусов ядерного генома, кодирующих запасные белки ячменя - гордеины - у стародавних сортов ячменя из Ближнего Востока, Северной Африки, Эфиопии и Южной Аравии. В цитируемой работе в один кластер попали образцы из Ирака, Йемена, Эфиопии, а также Сирии, Иордании. Второй кластер составили популяции из североафри-

канских стран – Марокко, Туниса, Алжира, Египта, а также Ближнего Востока – Израиля и Палестины. В нашей работе образцы из Израиля также кластеризуются с образцами из стран Северной Африки. Эта группа характеризуется наименьшим уровнем разнообразия хлоропластных геномов, что характерно также для современных сортов.

Попадание в один кластер образцов из Эфиопии, Йемена и Ирака говорит о том, что возможно, в Эфиопию ячмень попал из Плодородного полумесяца через Йемен. Такое предположение согласуется с исследованием полиморфизма ядерных локусов стародавних сортов ячменя из центров генетического разнообразия и историческими данными [26] и подтверждает теорию Н.И. Вавилова о связи ячменей Эфиопии, Йемена и Юго-Западной Азии [15].

Заключение

Исследование полиморфизма локусов хлоропластного генома стародавних сортов ячменя из Ближнего Востока, Северной Африки, Эфиопии и Южной Аравии дополняет исследование ядерных гордеин-кодирующих локусов ячменей из тех же регионов. В целом, исследования ядерных и хлоропластных геномов показали значительное сходство по результатам кластерного анализа. Объединение в одном кластере образцов из Эфиопии, Йемена и Ирака говорит о генетической связи ячменей Эфиопии, Южной Аравии и Юго-Западной Азии и подтверждает теорию Н.И. Вавилова о происхождении ячменя.

Проведенное исследование показало при-

менимость и информативность хлоропластных микросателлитных маркеров для анализа генетического разнообразия и установления филогенетических связей культурного ячменя.

Показан значительно более высокий уровень изменчивости хлоропластных геномов стародавних сортов ячменя по сравнению с современными. Выделены редкие гаплотипы, описанные в литературе лишь у диких *H. v. ssp. spontaneum*, шесть типов хлоропластного генома описаны нами впервые.

Таким образом, стародавние сорта ячменя из предполагаемых центров происхождения представляют интерес в качестве источника генетического разнообразия, потенциально полезного для практической селекции.

Список использованных источников

1. Kolodinska, B.A, Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin / B.A Kolodinska [et al.] // *Hereditas*. – 2004. – Vol. 141. – P. 186–192.
2. Asins, M.J, Carbonell, E.A. Distribution of genetic variability in a durum wheat world collection / M.J Asins, E.A. Carbonell // *Theor. Appl. Genet.* – 1989. – Vol. . – P. 77: 287–294.
3. Molina–Cano, J.L. Chloroplast DNA mic-

rosatellite analysis supports a polyphyletic origin for barley / J.L. Molina–Cano [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – Vol. 110. – P. 613–619.

4. Russell, J.R. Patterns of polymorphism detected in the chloroplast and nuclear genomes of barley landraces sampled from Syria and Jordan / J.R. Russell [et al.] // *Theor. Appl. Genetics.* – 2003. – Vol. 107. – N 3. – P. 413–421.

5. Orabi, J. The Horn of Africa as a centre of barley diversification and a potential domestica-

- tion site / J. Orabi [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – Vol. 114. – P. 1117–1127.
6. Provan, J. Polymorphic chloroplast simple-sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum* / J. Provan [et al.] // *Mol. Ecol.* – 1999 a. – Vol. 8. – P. 505–511.
7. Harlan, J. R. and de Wet. Towards a rational classification of cultivated plants / J. R. Harlan and de Wet // *Taxon*. – 1971. – Vol. 20. – P. 509–517.
8. Harlan, J.R., Zohary, D. Distribution of wild wheats and barley/ J.R. Harlan, D. Zohary // *Sciences*. – 1966. – V. 153. – N. 3741. – P. 1074–1080.
9. Zohary, D. Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East / D.Zohary // *Genet. Res. Crop Evol.* – 1999. – V. 46. – P. 133–142.
10. Badr, A. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*) / A. Badr [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2000. – Vol. 17. – P. 499–510.
11. Molina-Cano, J. L. Morocco as a possible domestication center for barley: biochemical and agromorphological evidence / J. L. Molina-Cano [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1987. – Vol. 73. – P. 531–536.
12. Molina-Cano, J. L. Further evidence supporting Morocco as a centre of origin of barley / Molina-Cano, J. L. [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1999 – Vol. 98. – P. 913–918.
13. Takahashi, R. The origin and evolution of cultivated barley // R. Takahashi // *Adv. Genet.* – 1955. – Vol. 7. – P. 227–266.
14. Bekele, E. A differential rate of regional distribution of barley flavonoid patterns in Ethiopia, and a view on the centre of origin of barley / E. Bekele // *Hereditas*. – 1983. – Vol. 98. – P. 269–280.
15. Вавилов, Н.И. Центры происхождения культурных растений // В кн. Происхождение и география культурных растений. Л.: Наука, – 1987. – С. 33–126.
16. Поморцев, А.А. Исследование полиморфизма гордеинов у ячменей Эфиопии / А.А. Поморцев // *Генетика*. – 2001. – Т. 37. – № 10. – С. 1371–1382.
17. Saisho, D. and Purugganan M. D. Molecular Phylogeography of Domesticated Barley Traces Expansion of Agriculture in the Old World / D. Saisho and M. D. Purugganan // *Genetics*. – 2007. – Vol. 177. – P. 1765–1776.
18. Morrell, P. L. and Clegg, M. T. Genetic evidence for a second domestication of barley (*Hordeum vulgare*) east of the Fertile Crescent / P. L. Morrell, and M. T. Clegg // *PNAS* – 2007. – Vol. 104. – N 9. – P. 3289–3294.
19. Bucci, G. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in halepensis-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers / Bucci, G. [et al.] // *Mol. Ecol.* – 1998. – Vol. 7. – P. 1633–1643.
20. Genetic discontinuity revealed by chloroplast microsatellites in eastern North American *Abies* (Pinaceae) / C.M. Clark, T.M. Wentworth, D.M.O. Malley // *Am. J. Bot.* – 2000 – Vol. 87. – P. 774–778.
21. Parducci, L. Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species / L. Parducci [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – Vol. 102. – P. 733–740.
22. Edwards, K. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis / K. Edwards, C. Johnstone, C. Thompson // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – Vol. 19. – P. 1349.
23. Луханина, Н.В. Микросателлитные последовательности хлДНК ячменя: снижение спектра изменчивости у культурных форм / Н.В. Луханина [и др.] // *Экологическая генетика*. – 2006. – Т. IV. – № 1. – С. 17–21.
24. Provan, J. An extreme cytoplasmic bottleneck in the modern European cultivated potato (*Solanum tuberosum*) is not reflected in decreased levels of nuclear diversity / J. Provan [et al.] // *Genetics*. – 1999 b. – V. 266. – P. 633–639.
25. Ishii T., Mori N., Ogihara Y. Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species / T. Ishii, N. Mori, Y. Ogihara // *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – Vol. 103. – P. 896–904.
26. Поморцев, А. А. Полиморфизм гордеин-кодирующих локусов в местных популяциях культурного ячменя (*Hordeum vulgare* L.) стран Ближнего Востока / А. А. Поморцев, С. П. Мартынов, Е. В. Лялина // *Генетика*. – 2008. – Т. 44. – N 6. – С. 815–828.

Дата поступления статьи 11 ноября 2010 г.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛОРУССКИХ ПОПУЛЯЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ И ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОД ПО ПОЛИМОРФНЫМ ВАРИАНТАМ ГЕНОВ СОМАТОТРОПИНОВОГО КАСКАДА (*bPit-1*, *bPrl*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*)

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

Введение

Маркер-сопутствующая селекция, *marker assisted selection* (MAS), – одна из современных селекционных технологий, сочетающая информацию о взаимосвязях генетического потенциала животных с его фенотипическим проявлением. Редкие полиморфные варианты генов, отвечающие за развитие количественных признаков, ассоциированные с повышенной продуктивностью животных, рассматриваются в качестве генетических маркеров. Центральным регулятором процессов роста и лактации у млекопитающих является гормон роста (соматотропин), а гормоны, передающие гуморальный сигнал на ткани-мишени, регулируют не только внутриклеточный белковый, но и углеводный и липидный метаболические пути. В настоящее время проводится активное исследование полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада для выявления генетических маркеров, ассоциированных с повышенной продуктивностью крупного рогатого скота. Такие работы представляют не только теоретический интерес, связанный с исследованием генетических механизмов формирования количественных признаков у животных, но и практический, связанный с повышением молочной продуктивностью в животноводстве [1, 2].

На данный момент в мире выявлен широкий спектр аллельных вариантов для ряда генов соматотропинового каскада. Однако, эти данные фрагментированы и трудно сопоставимы, так как изучение генетической структуры популяций крупного рогатого скота во многих странах проводится на различных породах, а связь

генетических полиморфизмов с продуктивностью анализируется по разным признакам.

Нами выполнено комплексное исследование генетической структуры популяций крупного рогатого скота, разводимого в республике, по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада, белковые продукты которых являются ключевыми звеньями гуморальной цепи. К ним относятся *HinFI*- и *StuI*-полиморфизмы гена гипофизарного фактора-1 (*bPit-1*), запускающего экспрессию гена гормона роста [3, 4], *RsaI*-полиморфизм гена пролактина (*bPrl*), белок 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].

Так как изучаемые полиморфизмы встречаются редко, а частота их отличается у представителей разных пород, то целью данной работы было сравнение генетической структуры белорусских популяций крупного рогатого скота по частотам встречаемости аллельных вариантов исследуемых генов.

Для исследования нами взяты две породы, представляющие наибольший практический интерес для белорусской селекции крупного

рогатого скота молочного направления. Голштинская порода является несомненным лидером среди пород молочного направления. Значение черно-пестрой породы обусловлено тем,

что ее представители адаптированы к условиям климата, содержания, обладают устойчивым иммунитетом к заболеваниям, распространенным на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из проб крови коров черно-пестрой (329 особей) и голштинской пород (118 особей), представленных животноводческими предприятиями Минской области.

Относительные частоты аллелей анализируемых генов ($P_{(A)}$) определяли методом прямого подсчета по формуле:

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

где N_1 – число гомозиготных особей по исследуемому аллелю;

N_2 – число гетерозигот;

n – объем выборки [9].

Статистическую ошибку (S_p) 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 ча-

стот аллельных вариантов исследуемых генов проводили с помощью критерия χ^2 . Число степеней свободы = 1.

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:

$$AA = p^2;$$

$$AB = 2pq;$$

$$BB = q^2 \text{ [11].}$$

Определение генотипа 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 ПЦР	Последовательности праймеров
<i>bPit-1-Hinf I</i> [3]	-94 - 1 мин; -(95° – 45 с; 56° – 60 с; 72° – 60 с) × 35 циклов; -72° – 10 мин	<i>Hinf I-F</i> : 5'-aaaccatcatctcccttctt-3'
		<i>Hinf I-R</i> : 5'-aatgtacaatgtgccttctgag-3'
<i>bPit-1-Stu I</i> [4]	-95° – 5 мин; -(95° – 45 с; 55° – 45 с; 72° – 45 с) × 35 циклов; -72° – 10 мин	<i>Stu I-F</i> : 5'-scaaatggctcttttctgtttacaggg-3'
		<i>Stu I-R</i> : 5'-ctttaaactcattggcaaacctttc - 3'
<i>bPrl-Rsa I</i> [5]	-95° – 5 мин; -(95° – 30 с; 63° – 30 с; 72° – 30 с) × 30 циклов; -72 – 10 мин	<i>Rsa I-F</i> : 5'-gccttccagaagtctgtttttc-3'
		<i>Rsa I-R</i> : 5'-cgagtccttatgagcttgattctt-3'

Продолжение таблицы

<i>bGH-AluI</i> [6]	-95° – 5 мин; -(95° – 30 с; 64° – 30 с; 72° – 60 с) × 30 циклов; -72° – 10 мин	<i>AluI</i> -F: 5'-ccgtgtctatgagaagc -3'
		<i>AluI</i> -R: 5'-gttcttgagcagcgcgt -3'
<i>bGHR-SspI</i> [7]	-95° – 5 мин; -(95° – 30 с; 60°-30 с; 72° – 30 с) × 30 циклов; -72° – 10 мин	<i>SspI</i> -F: 5-aatacttgggctagcagtgacaatat-3'
		<i>SspI</i> -R: 5'-acgtttcactggggttgatga-3'
<i>bIGF-1-SnaBI</i> [8]	-95° – 5 мин; -(95° – 30 с; 64°-30 с; 72°-30 с) × 35 циклов; -72° – 10 мин	<i>SnaBI</i> -F: 5'-attacaaagctgcctgcccc-3'
		<i>SnaBI</i> -R: 5'-accttaccgctatgaaaggaact-3'

Схемы ПДРФ-анализа для каждого из полиморфных локусов исследуемых генов представлены в таблице 2.

Таблица 2

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

Полиморфизм гена	Фермент	Замена нуклеотида /замена аминокислоты	Распознаваемый нуклеотид /аллель	Генотипы и соответствующие длины рестриционных 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^{FY}</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 и голштинской пород представлены в таблице 3.

Таблица 3

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

Название полиморфизма	Аллель	Относительная частота аллеля ± статистическая ошибка	
		Голштинская порода n=118	Черно-пестрая порода n=329
<i>bPit-1-HinF1</i>	<i>bPit-1-HinF1^A</i>	0,212±0,003	0,219±0,001
	<i>bPit-1-HinF1^B</i>	0,788±0,003	0,781±0,001
<i>bPit-1-StuI</i>	<i>bPit-1-StuI^A</i>	0,123±0,003	0,125±0,001
	<i>bPit-1-StuI^C</i>	0,877±0,003	0,875±0,001
<i>bPrl-RsaI</i>	<i>bPrl-RsaI^A</i>	0,890±0,003	0,878±0,001
	<i>bPrl-RsaI^B</i>	0,110±0,003	0,122±0,001
<i>bGH-AluI</i>	<i>bGH-AluI^L</i>	0,941±0,002	0,660±0,001
	<i>bGH-AluI^V</i>	0,059±0,002	0,340±0,001
<i>bGHR-SspI</i>	<i>bGHR-SspI^F</i>	0,809±0,003	0,777±0,001
	<i>bGHR-SspI^Y</i>	0,191±0,003	0,223±0,001
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^A</i>	0,593±0,004	0,574±0,001
	<i>bIGF-1-SnaBI^B</i>	0,407±0,004	0,426±0,001

Нами отмечено, что для каждого из исследуемых полиморфизмов аллель, являющийся редким среди животных голштинской породы, также оказывался редким среди животных черно-пестрой породы.

Результаты сравнения распределения частот аллельных вариантов генов соматотропического каскада в популяциях коров голштинской и черно-пестрой породы представлены в таблице 4.

Таблица 4

Сравнение распределения абсолютных частот аллелей генов соматотропического каскада в популяциях голштинского и черно-пестрого скота

Название полиморфизма	Аллель	Абсолютная частота аллеля		χ^2	p*
		Голштинская порода n=118	Черно-пестрая порода n=329		
<i>bPit-1-HinF1</i>	<i>bPit-1-HinF1^A</i>	50	144	0,05	0,82
	<i>bPit-1-HinF1^B</i>	186	514		
<i>bPit-1-StuI</i>	<i>bPit-1-StuI^A</i>	29	82	0,00	0,94
	<i>bPit-1-StuI^C</i>	207	576		
<i>bPrl-RsaI</i>	<i>bPrl-RsaI^A</i>	210	578	0,22	0,64
	<i>bPrl-RsaI^B</i>	26	80		
<i>bGH-AluI</i>	<i>bGH-AluI^L</i>	222	434	70,26	0,00*
	<i>bGH-AluI^V</i>	14	224		
<i>bGHR-SspI</i>	<i>bGHR-SspI^F</i>	191	511	1,10	0,29
	<i>bGHR-SspI^Y</i>	45	147		
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^A</i>	140	378	0,25	0,61
	<i>bIGF-1-SnaBI^B</i>	96	280		

*- Полученные данные статистически значимы при уровне значимости $P < 0,05$.

Как видно из таблицы 5, на межпородном уровне статистически значимые различия распределения частот аллельных вариантов выявляются только по *AluI* – полиморфизму гена гормона роста *bGH*.

Также нами было проанализировано распределение генотипов исследуемых генов сомато-

тропинового каскада в выборках популяций черно-пестрой и голштинской пород.

С помощью критерия χ^2 проведен анализ соответствия распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга. 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	Голштинская порода n=118		Черно-пестрая порода n=329	
		n	χ^2 *	n	χ^2
<i>bPit-1-HinF1</i>	<i>bPit-1-HinF1^{AA}</i>	5	0,03	14	0,32
	<i>bPit-1-HinF1^{AB}</i>	40		116	
	<i>bPit-1-HinF1^{BB}</i>	73		199	
<i>bPit-1-StuI</i>	<i>bPit-1-StuI^{AA}</i>	1	0,09**	0	5,56**
	<i>bPit-1-StuI^{AC}</i>	27		82	
	<i>bPit-1-StuI^{CC}</i>	90		247	
<i>bPrl-RsaI</i>	<i>bPrl-RsaI^{AA}</i>	93	0,01**	252	0,54**
	<i>bPrl-RsaI^{AB}</i>	24		74	
	<i>bPrl-RsaI^{BB}</i>	1		3	
<i>bGH-AluI</i>	<i>bGH-AluI^{LL}</i>	104	0,03**	179	77,58
	<i>bGH-AluI^{LV}</i>	14		76	
	<i>bGH-AluI^{VV}</i>	0		74	
<i>bGHR-SspI</i>	<i>bGHR-SspI^{FF}</i>	77	0,01**	198	0,02
	<i>bGHR-SspI^{FY}</i>	37		115	
	<i>bGHR-SspI^{YY}</i>	4		16	
<i>bIGF-1-SnaBI</i>	<i>bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	44	0,89	116	2,8
	<i>bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	52		146	
	<i>bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	22		67	

*- значения χ^2 для уровня значимости 0,05 составляет 3,84, жирным шрифтом обозначены случаи отклонения от теоретически ожидаемого [18]

**-значения χ^2 были рассчитаны с поправкой Йетса.

Отклонение распределения частот генотипов от теоретически ожидаемого равновесного Харди-Вайнберга наблюдается в популяции черно-пестрых коров по полиморфизмам *bPit-1-StuI* и *bGH-AluI*. По полиморфизму *bGH-AluI* относительная частота редкого аллеля *bGH-AluI^V* в этой популяции значительно превышает таковую в популя-

ции голштинских коров: 0,34 к 0,059 соответственно (табл. 3).

Относительно исследуемой популяции голштинских коров можно отметить, что по всем анализируемым полиморфизмам наблюдаемое распределение частот генотипов соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

Заключение

Нами проанализирована генетическая структура выборок из популяций двух наиболее распространенных на территории Беларуси пород крупного рогатого скота черно-пестрой и голштинской по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада. Изучены *bPit-1-HinFI* и *bPit-1-Stul*-полиморфизмы гена гипофизарного фактора роста-1, *bPRL-RsaI* полиморфизм гена пролактина, *bGH-AluI*-полиморфизм гена гормона роста и *bIGF-1-SnaBI*-полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста-1.

Анализ межпородного сравнения распределения частот полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада показал:

1. Редкий аллель, выявленный в популяции черно-пестрой породы, также является редким

и в популяции голштинской породы по всем исследованным полиморфизмам.

2. Сравнение распределения частот полиморфных вариантов исследуемых генов в популяциях голштинской и черно-пестрой пород выявило статистически значимые различия по *AluI*-полиморфизму гена гормона роста *bGH*, а именно, частота редкого аллеля *bGH-AluI^V* в популяции черно-пестрого скота в 5,7 раза выше, чем в популяции голштинской породы.

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

Список использованных источников

1. Miceikienė, I., Pečiulaitienė, N., Baltrėnaitė, L., Skinkytė, R., Indriulytė, R. Association of cattle genetic markers with performance traits. *BIOLOGIJA*. 2006. Nr. 1. – P. 24–29.
2. Hines, H.C., Ge, W., Zhao, Q., Davis, M.E. Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins. *Anim. Genet.* – 1998. 29(1): 69–74.
3. 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.
4. 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.
5. Khatami, S. R., Lazebny, O. E., Maksimenko, V. F. and Sulimova, G.E. Association of DNA Polymorphisms of the Growth Hormone and Prolactin Genes with Milk Productivity in Yaroslavl and Black-and-White Cattle. *Genetika*. 2005. T 41, № 2.
6. 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.
7. Zhou, G L, Liu, H G, Liu, C, Guo, S L, Zhu, Q and Wu, Y H. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *Journal of Biosciences*. – 2005. – V. 30. – 595 p.
8. 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.
9. Edriss, V., Edriss, V.A. Rahmani, H. R. Pit1 Gene polymorphism of Holstein Cows in Isfahan Province. *Biotechnology*. – 2008.7 (2): 209–2126.
10. Viorica, C., Vlaic, A., Gaborean U, HINFI polymorphism of K-casein and PIT1 genes in romaniansimmental cattle. *Lucrari tiintifice Zootehnie i Biotehnologii*, – Vol. 40 (1), (2007), Timisoara.
11. Pawar, R S, Tajane, K R, Joshi, C G, Rank, D N and Bramksht, B P Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle. *Indian Journal of Animal Sciences* 11 (9): 884–888, September 2007.
12. Fontanesy, L. Investigation of allele frequencies of the growth hormone receptor (GHR) F279Y mutation in dairy and dual purpose

cattle breeds / L.Fontanesy // Ital. J. Anim. Sci. – 2007. – Vol 6. – P. 415–420.

13. Mehmannaavaz, Y., Amirinia, C., Association of IGF–1 gene polymorphism with milk production traits and paternal genetic trends in Iranian Holstein bulls. African Journal of microbiology Research vol. 4 (1) – P. 110–114 January, 2010.

14. 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.

15. Lewin, H. A. Close linkage between bovine prolactin and BoLA–DRB3 genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing / H.A. Lewin // Genomics.–1992. – № 13. – P. 44–48.

16. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях./М.: Наука, 1989. 235 с.

17. Рокицкий, П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов // Минск: БГУ. – 1961. – 186 с.

18. Айала Ф., Кайгер Дж., Современная генетика. Т 3., М.: Мир, – 1988. – 335 с.

Дата поступления статьи 16 июня 2011 г.

М.Е. Михайлова¹, Н.М. Волчок¹, Норис Роа², Карин Дрешер²

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРИЗНАКОВ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С (-1689) ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНА АЛЬФА-ЛАКТАЛЬБУМИНА (α -LA)

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

²Институт сельскохозяйственных исследований
Боливарианская республика Венесуэла

Введение

Известно, что количество белков в молоке и их структура имеют большое экономическое значение для перерабатывающей промышленности и в значительной степени определяют количество и технологические свойства молока. Одним из таких биологически значимых протеинов является многофункциональный белок – α -лактальбумин (α -LA), входящий в состав молочной сыворотки, наличие которого является важным признаком качества молока, характеризующим его полезные свойства.

Этот небольшой глобулярный протеин, состоящий из 123 аминокислот и имеющий молекулярную массу 14кД, играет важную роль в биосинтезе лактозы. При участии эпителиальных клеток молочной железы, α -LA в комплексе с галактозилтрансферазой участвует в формировании фермента лактозсинтазы, который, в свою очередь, синтезирует лактозу в аппарате Гольджи, а лактоза, затем, в комплексе с α -LA секретируется в молоко. Содержание α -LA и лактозы в коровьем молоке составляет около 1,5 г/л, что соответствует 5%. Лактоза, содержащаяся в секреторных везикулах эпителиальных клеток молочных желез, создает внутри клетки повышенное осмотическое давление, благодаря которому внутрь везикул поступает вода. Таким образом, повышение концентрации α -LA, являющегося ключевым регулятором синтеза лактозы, вызывает пропорциональное увеличение выхода молока [1].

Ген, кодирующий бычий α -лактальбумин (α -LA), локализован у КРС в 5 хромосоме и

состоит из 2023 п.н., включая 4 экзона и 3 интрона. Ген α -LA характеризуется наличием нескольких полиморфных вариантов: в позициях +15, +21, +54 [2] и -1689 [3], относительно точки старта транскрипции 5' фланкирующего региона. Вариабельность в этом регионе может приводить к различной способности связывания РНК-полимеразы и факторов транскрипции, участвующих в регуляции экспрессии гена. Теоретически, замены в последовательности генетических регуляторных элементов в данном участке могут изменять степень экспрессии мРНК, кодируемой этим геном [1].

Данные полиморфизмы являются следствием точковых мутаций, в частности в позиции -1689, замена аденина на гуанин приводит к образованию двух аллельных вариантов гена. Аденин в этой позиции был обозначен как А-аллель, а гуанин – как В-аллель [2,3]. Lundén А. с соавторами была показана взаимосвязь между (-1689) полиморфизмом и концентрацией лактозы в молоке. Так у коров с АА-генотипом с 1кг молока выделяется лактозы больше на 0,08 %, чем у особей с другими генотипами [4].

Таким образом, учитывая роль α -лактальбумина в биосинтезе лактозы и продукции молока в целом, ген α -LA может быть использован как потенциальный генетический маркер молочной продуктивности КРС, в частности, удойности и белковомолочности.

Целью данного исследования было изучить (-1689) полиморфизм 5' фланкирующего региона гена α -лактальбумина, провести анализ генетической структуры популяций

КРС некоторых животноводческих комплексов Беларуси по локусу α -*LA*, а также изу-

чить взаимосвязь данного полиморфизма с признаками молочной продуктивности.

Материалы и методы

Исследования проводились на коровах и быках черно-пестрой породы, принадлежащих животноводческим комплексам Минской области. Для анализа были использованы образцы свежезамороженной спермы и крови. Выделение ДНК проводилось методом солевой экстракции по стандартной методике [5]. Выделенную ДНК ресуспензировали и измеряли ее концентрацию с помощью электрофореза в 0,8% агарозном геле, используя маркер молекулярного веса GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

С целью типирования аллельных вариантов гена α -*LA* использовали метод ПЦР с последующим анализом ПДРФ. На основе данных о сиквенсе участка гена, в котором был обнаружен (-1689) полиморфизм [3], было синтезировано два олигонуклеотидных праймера, которые амплифицируют участок, размером 430 п.н., расположенный в пределах от -1803 до -1373, относительно точки старта транскрипции:

ALF-LAC1: 5'-aag agt tgg atg gaa tca cc-3'

ALF-LAC2: 5'-ttc aaa ttg ctg gca tca agc-3'

ПЦР проводили на программируемом термоциклере «Biometra» (Германия) в объеме

20 мкл, содержащем: 2 мкл 10 x ПЦР-буфера, 2 мкл MgCl₂ (25 мМ), 0,5 мкл dNTP (10 мМ), по 1 мкл каждого из праймеров (10 пМ/мкл), 0,3 мкл Taq-полимеразы (5 ea /мкл), 2 мкл ДНК (20 нг/мкл). Вариант программы реакции амплификации состоял из следующих этапов: первичное плавление матрицы – 5 мин – 94°C; 30 циклов (30с – 95°C; 30с – 63°C; 30с – 72°C); синтез – 10 мин при 72°C. Полученный таким образом амплификат подвергался гидролизу рестрицирующей эндонуклеазой *Sdu I* в соответствующем буфере [6]. Продукты рестрикции разделяли в 2% агарозном геле в течение часа при напряжении 40 (в качестве маркера использовали 50 br DNA Lader (Fermentas)), визуализировали в УФ-трансиллюминаторе при длине волны 310 нм и регистрировали с помощью цифровой фотокамеры Canon. Аллельные варианты гена α -*LA* определяли по количественным и качественным признакам ПДРФ. Наличие двух полос размером 328 и 102 пн. соответствовало генотипу AA; четырех полос размером 328, 211, 117 и 102 пн. — генотипу АВ, трех полос размером 211, 117 и 102 пн. – генотипу ВВ.

Результаты и обсуждение

Как отмечено в работах других исследователей наиболее предпочтительным генотипом, ассоциированным с повышенным содержанием лактозы в молоке, а, следовательно, с повышенным удоем, является генотип AA [2, 4]. Проведенный нами анализ генетической структуры популяций КРС по локусу α -*LA* выявил следующее распределение частот генотипов: AA- 45,9%; АВ – 43,3% и ВВ –

10,8%. Частота встречаемости аллелей А и В в среднем составила 0,68 и 0,32 соответственно (табл. 1), что согласуется с данными, полученными зарубежными коллегами [2,3]. Наибольшая частота предпочтительного А-аллеля была зарегистрирована в популяции РСУП «Минскплемпредприятие», где она составила 0,73, а наименьшая в РУСПП «1-я Минская птицефабрика» – 0,54.

Таблица 1

Генетическая структура популяций быков и коров белорусской черно-пестрой породы по локусу α -лактальбумина

Принадлежность	Количество особей (n)	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллелей	
		AA	AB	BB	A	B
РСУП «Минск племпредприятие»	148	56,1	33,8	10,1	0,73±0,036	0,27±0,036
РУСП «Племенной завод Красная звезда»	50	40,0	46,0	14,0	0,63±0,068	0,37±0,068
СПК «Агрокомбинат «Снов»	290	47,6	45,5	6,9	0,70±0,027	0,30±0,027
РУСПП «1-я Минская птицефабрика»	98	28,6	50,0	21,4	0,54±0,050	0,46±0,050
Всего	586	45,9	43,3	10,8	0,68±0,019	0,32±0,019

Для выяснения ассоциации аллельных вариантов гена α -LA с молочной продуктивностью КРС, а именно, общим удоем за 305 суток, процентным содержанием жира и белка в молоке, нами была проведена теоретическая оценка коров по данным признакам на основании информации, содержащейся в племенных

картах. Полученные результаты были проанализированы и сопоставлены, с целью чего для каждого животного рассчитывались средние значения показателей вышеперечисленных признаков. Затем среднее значение каждого из показателей было рассчитано для отдельной группы генотипов (табл. 2).

Таблица 2

Средние показатели продуктивности коров по аллельным вариантам гена α -LA

	Удой (л)	Жир (%)	Белок (%)
α -LA ^{AA}	9517,4±106,8	3,78±0,03	3,17±0,01
α -LA ^{AB}	9269,0±101,8	3,79±0,02	3,18±0,01
α -LA ^{BB}	9006,2±179,8	3,88±0,02	3,17±0,01

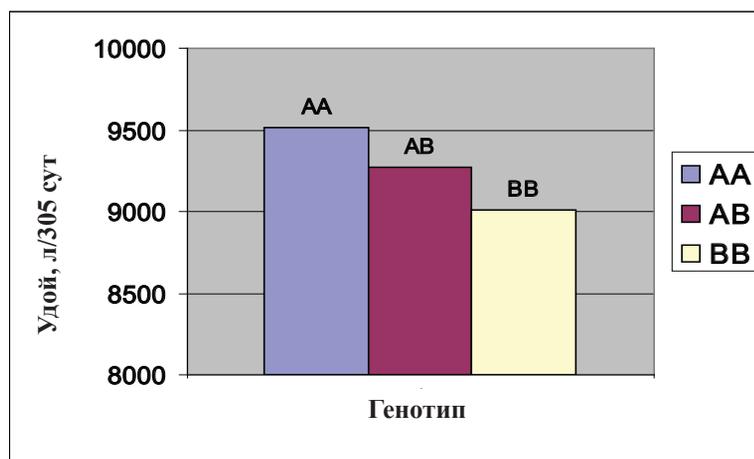


Рис. 1. Средний показатель удоя за 305 сут. лактации у коров разных генотипов.

Из представленной диаграммы, очевидно, что наибольший уровень продуктивности по показателям общего удою характерен для коров с генотипом $\alpha-LA^{AA}$. Особи с генотипом $\alpha-LA^{BB}$ имеют по удою наименьшие показатели. В частности, рассчитано, что животные с генотипом $\alpha-LA^{AA}$ имеют в среднем, на 5,4% больший показатель по этому признаку по сравнению с особями, обладающими $\alpha-LA^{BB}$ генотипом (рис. 1).

Относительно показателей процентного содержания в молоке белка и жира не было выявлено статистически достоверных различий между обладателями $\alpha-LA^{AA}$ и $\alpha-LA^{BB}$ генотипов.

Таким образом, проведение генотипирования крупного рогатого скота по (-1689) полиморфизму гена $\alpha-LA$, с целью выявления ценных аллельных вариантов, можно использовать в маркер-зависимой селекции, направленной на увеличение удою.

Заключение

Проведено ДНК-типирование аллельного варианта А гена α -лактальбумина в популяциях КРС, определены частоты данного аллеля в различных хозяйствах. Экспериментально доказана ассоциация (-1689) полиморфизма гена $\alpha-LA$ с признаками молочной продуктивности, в част-

ности – положительная корреляция А аллеля с общим удою. Показана возможность практического использования метода ПЦР-типирования крупного рогатого скота по гену $\alpha-LA$ в маркер-зависимой селекции, направленной на увеличение продукции молока.

Список использованных источников

1. Bleck, G.T., Bremel, R.D. Correlation of the α -lactalbumin (+15) polymorphism to milk production and milk composition of holsteins // J. Dairy Sci. – 1993. – Vol. 76. – P. 2292–2298.
2. Wojarój-nosowicz, B., Kaczmarczyk, E., Bongarc, E., Małolepszy, J. Natural BLV infection and polymorphism within the 5' flanking region of the α -lactalbumin gene in black-and-white breed cattle // Bull Vet. Inst. Pulawy. – 2005. – Vol. 49. – P. 439–442.
3. Voelker, G.R., Bleck, G.T., Wheeler, M.B. Single-base polymorphisms within the 5' flanking region of the bovine α -lactalbumin gene // J. Dairy Sci. – 1997. – Vol. 80. – P. 194–197.
4. Lundén, A., Lindersson, M. α -Lactalbumin polymorphism in relation to milk lactose // "Proc. VIth World Congr. on Gen. Appl. to Livestock Prod., Armidale, NSW, Australia, 11–16 January". – 1998. – Vol. 25. – P. 47–50.
5. Зиновьева, Н.А., Гладырь, Е.А., Эрнст, Л.К., Брем, Г. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных. – Дубровицы. – 2002. – 112 с.
6. Kamiński, S. Identification of Sdu I polymorphism within 5' flanking region of bovine alpha-lactalbumin gene // Anim. Sci. Pap. Rep. – 1999. – Vol. 17. – P. 23–27.

Дата поступления статьи 16 июня 2011 г.

ИММОРТАЛИЗАЦИЯ И ОНКОТРАНСФОРМАЦИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

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

Введение

Раковая трансформация – это сложный многостадийный процесс, протекающий на молекулярном, генетическом, клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях в результате воздействия и взаимодействия различных по своей природе экзо- и эндогенных канцерогенных факторов, приводящий при неблагоприятных для организма условиях к развитию злокачественной опухоли [1]. Возможно, эта многоэтапность возникла вследствие того, что в эволюции вырабатывались все новые механизмы противодействия неконтролируемому размножению трансформированных клеток. Благодаря этому обеспечивалось замедление развития раковых заболеваний и тем самым гарантировалась увеличенная продолжительность жизни у сложных организмов с длительным периодом развития [1].

Главным достижением в исследовании рака в течение последних десятилетий явилось выявление многостадийности канцерогенеза на молекулярно-генетическом уровне при возникновении опухолей во многих тканях и органах [2-6].

Согласно современным представлениям в процессе онкотрансформации принято выделять 3 основные стадии: инициации, промоции и прогрессии.

Известно, что при прохождении различных стадий онкогенеза клетки приобретают такие признаки как морфологические изменения, уменьшение потребности в ростовых факторах, отсутствие контактного торможения (способность к многослойному росту), независимость роста от прикрепления к субстрату, прививаемость (способность образовывать опухоли у сингенных животных), способность к инвазии и метастазированию, развитие мно-

жественной лекарственной резистентности [7-9]. Однако до сих пор не сложилось четкого представления о последовательности приобретения перечисленных признаков злокачественного фенотипа в соответствии с протеканием различных этапов раковой трансформации.

Общепризнано, что опухолевая трансформация как доброкачественных, так злокачественных новообразований начинается стадией инициации [1,10-12].

На ранних этапах онкотрансформации индуцируется образование частично трансформированных (иммортиализированных) клеток, которые приобретают как минимум три свойства:

1) Приобретение способности к неограниченной пролиферации, связанной с преодолением лимита Хайфлика [10-12];

2) В клетках блокируется процесс терминальной дифференцировки, что приводит к анаплазии, т.е. к утрате нормальной тканевой структуры (изменение размеров и формы отдельных тканевых образований, взаимного расположения клеток или полное отсутствие тканевых структур) [11];

3) Проявление субстратной независимости в способности иммортиализированных клеток пролиферировать в жидкой и полужидкой средах, в то время как большинство типов нормальных клеток могут размножаться лишь при условии их прикрепления к определенному внеклеточному матриксу [12].

Различие между иммортиализированными и раковыми клетками, культивируемыми *in vitro*, заключается в способности раковых клеток вызывать развитие злокачественных новообразований при трансплантации их восприимчивым животным [10]. Для проведения таких

исследований, как правило, используются иммунодефицитные мыши линии SCID (severe combined immunodeficiency mice – мыши с тяжелой иммунологической недостаточностью, иммунодефицит определяется отсутствием Т- и В- лимфоцитов) и NOD-SCID (Nonobese Diabetic SCID – мыши SCID с диабетом без ожирения, иммунодефицит характеризуется отсутствием Т-, В- и NK-лимфоцитов) [13].

Иммуортализация является ключевой стадией канцерогенеза, но недостаточной для опухолевой прогрессии. Так, было показано, что мутация онкогена *ras* вызывает раковую трансформацию SV40-иммуортализированных фибробластов, но не приводит к злокачественному перерождению нормальных фибробластов человека (не трансфицированных полиомавирусом SV40) [14]. При сходных экспериментах, связанных с изменением активностей генов опухолевых супрессоров, таких как *p53* и *p16 INK4a*, онкотрансформация наблюдалась в культурах фибробластов человека, предварительно иммуортализированных вирусом SV40 [15,16].

К генам иммуортализации можно отнести *myc* [17], *p16/p53* [15,16], *bcl-2* [18], *ras* [19], *fos* [20] и др. Общим для этих генов является то, что они кодируют ядерные белки, связывающиеся с ДНК и ядерным матриксом. Кроме того, их активация осуществляется не только путем мутаций, при которых изменяется нуклеотидная последовательность кодирующего участка гена, но и посредством амплификации и эпигенетической регуляции, одним из механизмов которой является метилирование цитозиновых оснований в ДНК [9, 21].

Согласно теории многоэтапности канцерогенеза полагают, что на стадии промоции иммуортализированные клетки под воздействием различных факторов начинают интенсивно размножаться, образуя колонии клеток, вытесняющие нормальные клетки в тканях. При этом идет процесс закрепления возникших генетических нарушений в новых клеточных поколениях. Кроме того, на данной стадии начинают выявляться молекулярно-генетические и морфологические отличия между клетками одной и той же опухоли, так называемая гетерогенность [22-24].

Стадия прогрессии сводится к перерождению частично трансформированных клеток

в опухолевые. Такое превращение осуществляется за счет накопления различных генетических и эпигенетических изменений, необходимых для окончательного становления злокачественного фенотипа клеток *in vivo* и *in vitro*. Четкого перехода между клетками разных стадий до сих пор не выявлено, поэтому деление на эти 3 этапа является условным [25].

Последние годы ознаменовались бурным развитием исследований в области стволовых клеток (СК). Благодаря накоплению новых данных о биологии соматических СК взрослого организма представления о механизмах раковой трансформации и иммуортализации обогатились сведениями, которые позволяют утверждать, что в основе молекулярных событий и клеточных процессов лежат явления, связанные с возникновением и существованием раковых стволовых клеток (РСК). В соответствии с принятой в цитоонкологии концепции РСК раковые клеточные популяции как *in vivo*, так и *in vitro* состоят в основном из стареющих клеток, которые либо вообще не делятся и погибают, либо формируют небольшие клеточные клоны, также обреченные на гибель. Возможность неограниченного роста раковой клеточной популяции обеспечивается потенциально бессмертными РСК, которые не только воспроизводят сами себя, но также дифференцируются в стареющие клетки [26].

Существование стволовых клеток опухоли было продемонстрировано впервые в 1994 году группой исследователей из Торонто (США) под руководством Джона Дика. Они показали, что только маленькая популяция клеток лейкемии, экспрессирующих поверхностные маркеры нормальных стволовых клеток (CD34+CD38–), была способна вызывать лейкемию у мышей. Кроме того, популяции раковых клеток, размножающиеся в организме мышей, имели те же характеристики, что и образцы, откуда они были взяты [27]. Подобные результаты на примере солидных опухолей были впервые получены в лаборатории Кларка из University of Michigan Medical School (США). Исследователи в 2003 году продемонстрировали, что в опухолях молочной железы существует субпопуляция стволовых клеток опухоли с поверхностными маркерами CD44+CD24– [28].

До сих пор в цитоонкологии остается ак-

туальным вопросом происхождения стволовых клеток, индуцирующих злокачественный рост, и существует множество гипотез о потенциальных клеточных механизмах канцерогенеза.

Большинство исследователей связывают происхождение РСК с перерождением соматических СК взрослого организма в результате накопления генетических мутаций или эпигенетических изменений под воздействием эндогенных и экзогенных факторов [29-31]. В этом плане уместно отметить, что впервые идея возникновения рака из эмбриональных клеток (когда еще не было известно о существовании СК) была предложена Рудольфом Вирховом в 1858 год. После этого Cohnheim и Durante сформулировали «эмбриональную теорию», где источником злокачественных и доброкачественных новообразований считались эмбриональные зачатки, содержащиеся во всех тканях и органах взрослого организма [32].

Другим возможным источником возникновения РСК считаются прогениторные клетки или дифференцированные соматические клетки, которые вновь восстанавливают свойства стволовых клеток и становятся злокачественными [33, 34].

Альтернативный механизм основан на гипотезе возникновения РСК в результате слияния СК с дифференцированной соматической клеткой и образованием гибридных клеток со свойствами РСК или способными становится РСК в дальнейшем [35-36]. Имеется ряд данных о слиянии (cell fusion) кроветворных СК и мезенхимальных СК *in vivo* и *in vitro* с клетками различных тканей. Такие исследования, в частности, были выполнены в работах с трансгенными линиями мышей по генным системам Cre/loxP под руководством Manuel Alvarez-Dolado [37-38] и Sabine Bonde [39]. Вместе с тем в литературе высказываются сомнения в том, что спонтанное слияние клеток является реальным механизмом возникновения РСК. На наш взгляд, для прояснения этого вопроса целесообразно использовать компьютерную видеомикроскопию на уровне единичных клеток.

Понимание клональной эволюции клеточной популяции опухоли на уровне отдельных клеток начиная от появления первых трансформированных клеток до становления инвазивных карцином является важным условием разработки эффективных методов антираковой

терапии. Так, в работах Джордана Крэйга из медицинского центра университета Рочестера продемонстрировано, что стволовые клетки лейкемии гораздо более устойчивы к химиотерапии и радиотерапии, чем дифференцированные миелобластные клетки, составляющие большую часть клеточной популяции [40]. Уничтожение РСК – обязательное условие эффективной терапии опухолей различного генеза. Рецидив, возникающий после уничтожения основной массы опухоли и проведенной химио- или радиотерапии, может объясняться именно тем, что РСК не были полностью элиминированы. Таким образом, изучение клональной гетерогенности является принципиально важным аспектом в выявлении РСК, а значит и в разработке новых средств антираковой терапии [21-22, 41, 42].

Распознавание РСК и выявление этапов становления злокачественного фенотипа клеток является важным аспектом эпигенетической терапии, основанной на разработке антираковых средств, которые индуцируют направленную дифференцировку РСК если не в нормальные, то, по крайней мере, в стареющие раковые клетки, в конечном счете погибающие [42-44]. Разработка антираковых препаратов, направленно изменяющих дифференцировку РСК, находится в самом начале своего развития. Так, например, успехом эпигенетической терапии является применение для лечения промиелоцитарной лейкемии ретиноевой кислоты (метаболита витамина А), индуцирующего клеточную дифференцировку [42], найден ингибитор ДНК-метилтрансферазы 5-азацитидин [43]. Эндрю Файером и Крэггом Мелло открыто явление РНК-интерференции [44], на которое сейчас возлагаются большие надежды. К сожалению, еще не разработаны наиболее эффективные способы управления эпигенетической изменчивостью раковых стволовых клеток в направлении клеточного старения и гибели.

Возникающие сложности в поиске новых антираковых средств можно объяснить тем, что на сегодняшний день исследования выполняются, как правило, на большой совокупности клеток. Разрешающая способность существующих молекулярно-генетических методик не позволяет проследить весь путь клональной эволюции и многоэтапность ра-

ковой трансформации на уровне отдельных клеток, начиная с возникновения генетических изменений в индивидуальных клетках и заканчивая распространением этих изменений по всей клеточной популяции. Дальнейшее развитие цитоонкологии будет во многом связано с исследованием генетических процессов на

уровне отдельных клеток посредством компьютерной видеомикроскопии. В данной работе представлены результаты исследования процесса спонтанной иммуортализации клеточной популяции эмбриональных фибробластов человека с помощью витальной компьютерной видеосъемки.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали культивируемые *in vitro* эмбриональные фибробласты человека (ИФЧ). Для получения клеточной линии кожно-мышечную ткань 8-12 недельных эмбрионов человека переводили в культуру клеток. Для этого измельченную ткань дезагрегировали 0,25%-ным раствором трипсина при 37°C в течение 30 мин. После удаления трипсина осадок суспендировали в ростовой среде, добавляли в культуральный сосуд CO₂ (5% от объема сосуда) с помощью шприца, герметически закупоривали сосуд и культивировали клетки при 37°C.

Для длительного поддержания ИФЧ использовались 2 способа. При первом – клеточный монослой периодически обрабатывали 0,25%-раствором трипсина или смесью растворов трипсина и версена (0,02%) в отношении 1:1, после чего отмывали ферменты средой Игла, суспендировали клетки и высе-

вали их в новые культуральные сосуды. При втором, менее трудоемком способе, культуру поддерживали путем еженедельной смены среды. Культуральная среда содержала среду Игла, 10% эмбриональной сыворотки телят (ЭТС) и антибиотики (0,01% пенициллина и стрептомицина).

Для анализа живых иммуортализированных фибробластов человека был собран компьютерный видеоконкомплекс, включающий инвертированный микроскоп с термокамерой и цветную видеокамеру, подключенную к компьютеру. Для компьютерной видеосъемки сосуд Карреля с клетками помещали в термокамеру (37°C) инвертированного микроскопа. С помощью визуального просмотра выбирали участок культуры на дне культурального сосуда и выполняли автоматическое компьютерное фотографирование либо видеосъемку клеток.

Результаты и обсуждение

Постоянные (иммуортализированные) клеточные линии человека являются перспективной экспериментальной моделью в изучении последовательности процессов малигнизации клеток. Однако частота раковой трансформации эмбриональных фибробластов человека *in vitro* происходит гораздо реже по сравнению с фибробластами мыши [45]. Таким образом, получение иммуортализированной линии человека *in vitro* – это кропотливый трудоемкий процесс, требующий затраты большого количества времени, но далеко не всегда заканчивающийся достижением желаемого. Именно по этой причине большинство лабораторий мира работают с культурами перевиваемых линий, источниками которых являются клетки опухолей человека, обладающие способностью к росту в течение неограниченного периода в

условиях продолжительного культивирования. В качестве примеров перевиваемых культур человека можно привести: HeLa (из злокачественных новообразований шейки матки), Нер-1 (из опухоли печени), А549 (из рака легкого) [46]. Следует отметить, что главным недостатком перевиваемых культур является то, что они не пригодны для наблюдения начальных этапов неопластической трансформации и постепенного становления злокачественного фенотипа.

В лаборатории моделирования генетических процессов ИГЦ НАН Беларуси была выделена спонтанно иммуортализированная культура фибробластов эмбриона человека. Подробная схема получения постоянной линии фибробластов человека представлена на рисунке 1.

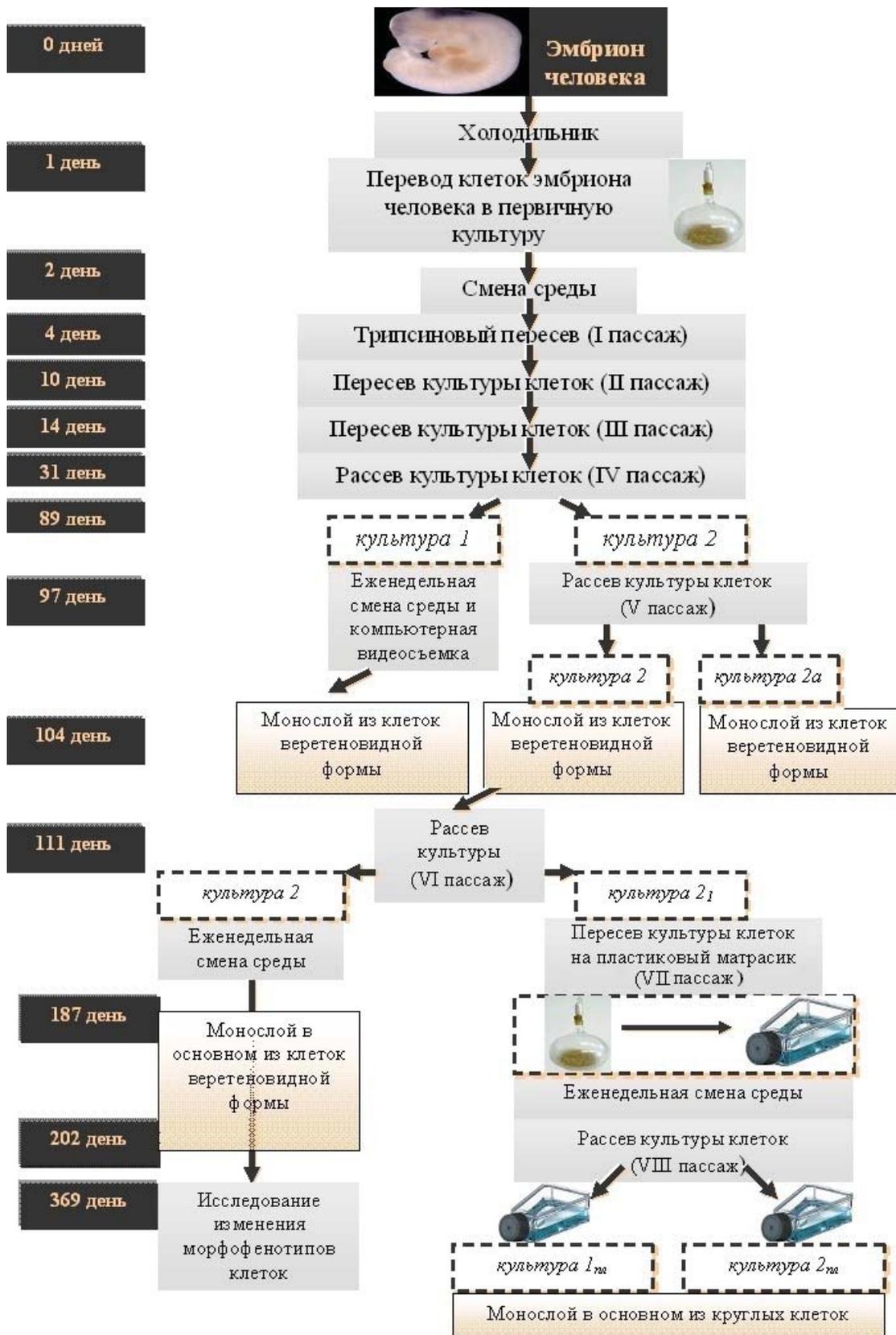
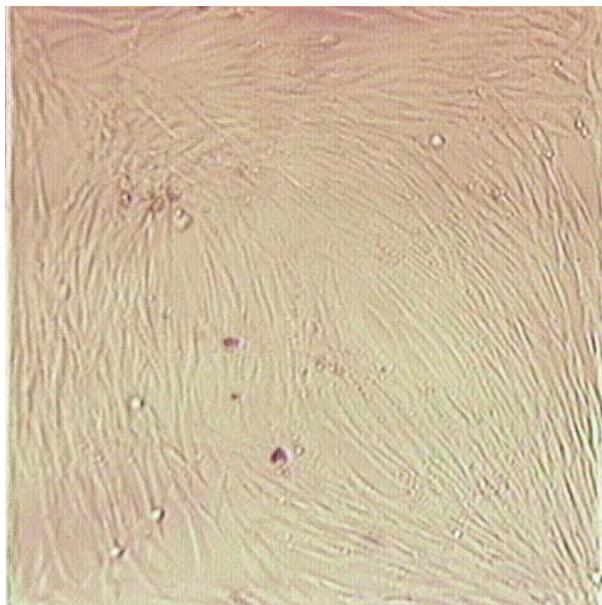


Рис. 1. Основные этапы получения иммортализированной культуры из эмбриона человека



100 мкм

Рис. 2. Аномально густой монослой культуры фибробластов человека, образованный клетками удлиненной веретеновидной формы, на 104 сутки культивирования

Первый этап был зафиксирован на 104 сутки культивирования. В культуре фибробластов человека наблюдали аномально густой монослой, состоящий исключительно из веретеновидных клеток. В данной культуре клетки отличались от нормальных фибробластов тем, что обладали нетипичной сверхудлиненной формой (рис. 2).

По истечении следующих 7 суток на дне культурального сосуда зарегистрировали единичные многослойные агрегаты на фоне монослоя, состоящего из веретеновидных клеток (рис. 3). Ослабление контактного торможения, проявляющееся в образовании многоклеточных агрегатов, является признаком дальнейших изменений клеток в направлении ракового фенотипа. Кроме того, образование многослойных клеточных агрегатов свидетельствует о том, что в данной

культуре клетки сохраняют высокий пролиферативный потенциал, но не переходят в состояние старения (senescence), которое характеризуется резким нарушением метаболизма и, прежде всего, прекращением репликации ДНК. Вслед за этим, по данным Л. Хайфлика, обычно вскоре наступает фаза гибели клеток [47].

На 187 сутки культивирования был произведен трипсиновый рассев культуры 2 (VI пассаж), представленной в основном клетками веретеновидной формы, на две культуры (2 и 2₁). В обеих этих культурах после недельного культивирования было отмечено появление редко расположенных клонов, состоящих из мелких округлых клеток. Такая форма клеток атипична для эмбриональных фибробластов человека, зато является характерной для трансформированных клеток.

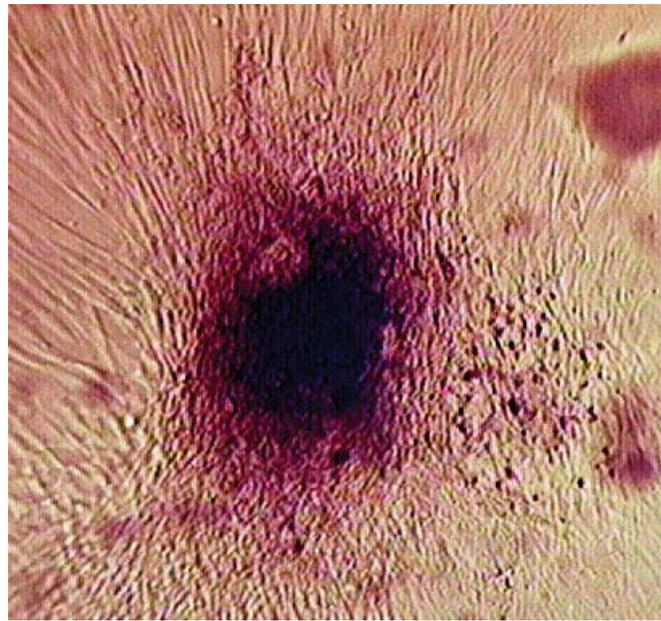


Рис. 3. Появление многоклеточных фокусов на фоне веретеновидных клеток как свидетельство спонтанной иммуортализации

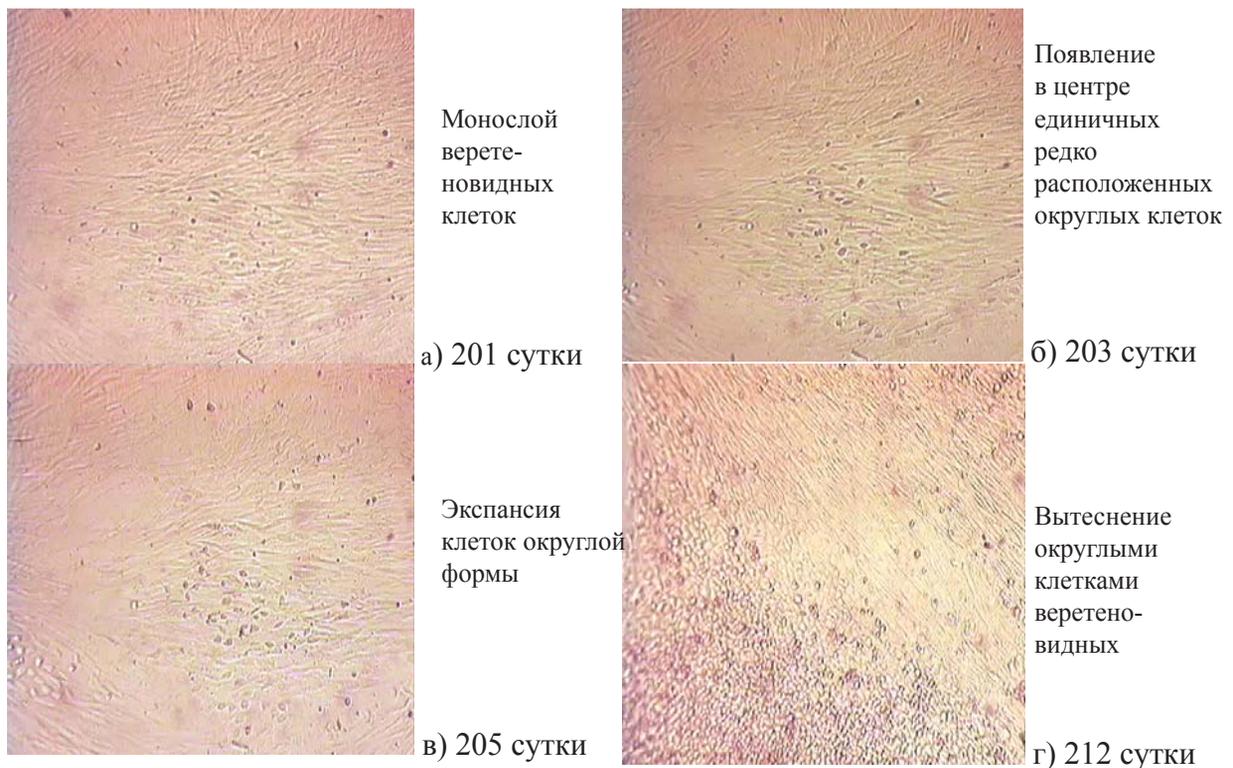


Рис. 4. Возникновение и экспансия аномальных округлых клеток на фоне веретеновидного монослоя.

По истечении 201 суток образовался густой монослой, состоящий из клеток веретеновидной формы. После этого культуру 2_1 рассеяли на два пластиковых матрица ($1_{пл}$ и $2_{пл}$). Куль-

туру поместили на непрерывную видеосъемку (рис. 4).

Анализ видеозаписи продемонстрировал, что клетки округлой формы обладают более

высоким пролиферативным потенциалом, чем клетки веретеновидной формы, которые были практически полностью вытеснены в обоих пластиковых флаконах к 256 суткам культивирования. Можно было предположить, что появление фокусов округлых клеток связано с переводом культуры из стеклянных сосудов Карреля в пластиковые культуральные флаконы. Однако в дальнейшем этот процесс был зарегистрирован и при продолжительном культивировании клеток в стеклянных сосудах.

В ходе данного эксперимента на разреженных участках культуры были зарегистриро-

ваны процессы округления веретеновидных клеток (рис. 5-6). Эти события, в соответствии с полученными ранее данными сотрудников ИГЦ НАН Беларуси по непрерывной видеосъемке клеточных культур, могут быть интерпретированы либо как клеточная гибель, либо округление клеток перед митозом [48-51]. Однако не исключено, что в данном случае происходили процессы возникновения округлых клеточных морфотипов из веретеновидных. Для однозначного выбора из этих возможностей планируется проведение дополнительных исследований.

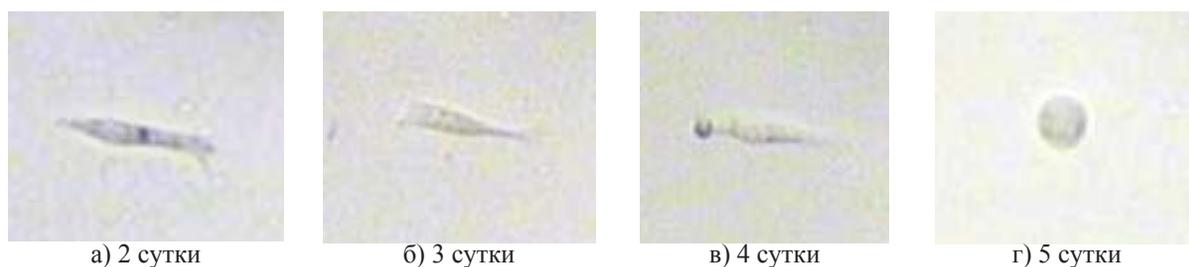


Рис. 5. Динамика изменения формы клетки на одном участке субстратной пластинки (квадрат 05-2).

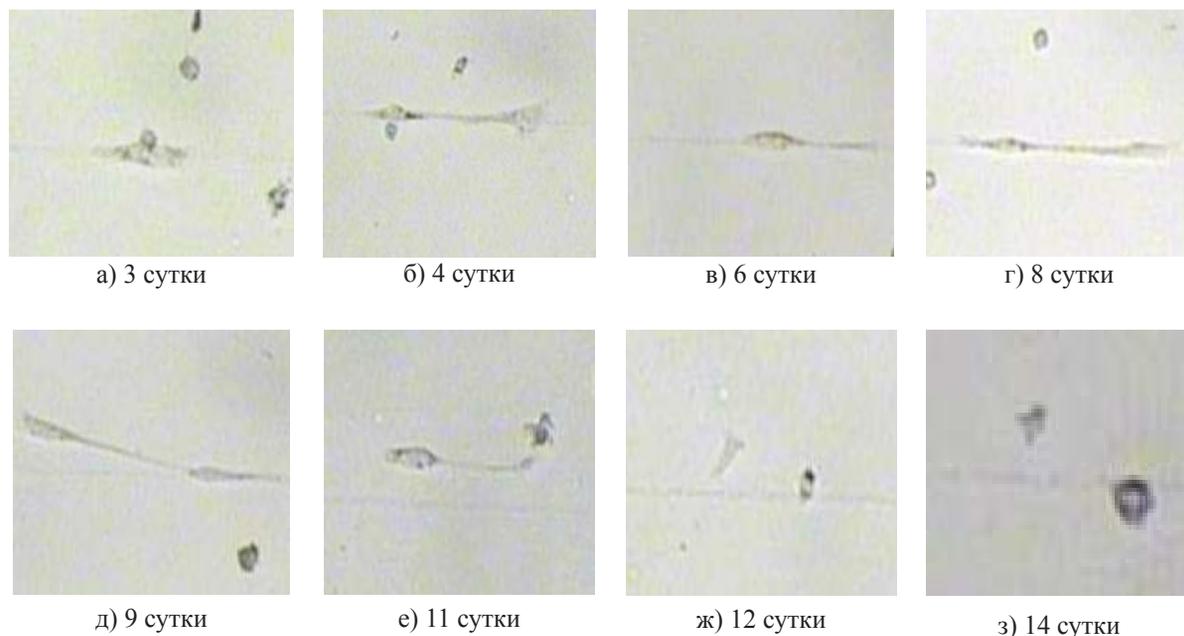


Рис. 6. Изменение клеточной формы в процессе митотического деления, в результате которого из веретеновидной клетки образуются две округлые, что может свидетельствовать о симметричной дифференцировке. На 6 сутки произошло временное «обратное слияние» двух дочерних клеток (квадрат 12-7).

Заключение

С помощью компьютерной микроскопии впервые описаны закономерности спонтанной иммуортализации и дальнейших изменений клеточной популяции в направлении ракового фенотипа в культурах фибробластов, полученных из эмбриона человека. При длительном культивировании эмбриональных фибробластов человека *in vitro* на первом этапе иммуортализации наблюдалось образование чрезвычайно густого монослоя из атипично удлиненных веретеновидных клеток. На втором этапе в веретеновидном монослое образовывались многослойные агрегаты (фокусы). Третий этап заключался в появлении единичных округлых клеток, несвойственных стареющим культурам фибробластов. На четвертом этапе округлые клетки полностью вытесняли веретеновидные. Полученные данные демонстрируют, что веретеновидные клетки являются ранним этапом эволюции фенотипа раковых

клеток. Дифференцировка веретеновидных клеток в округлые происходит не массово, а в некоторых местах ростового субстрата, что свидетельствует в пользу невысокой частоты морфотипических изменений, количественная оценка которой может быть выполнена с помощью параллельной автоматизированной видеосъемки многих участков культуры.

Представляется целесообразным применение продолжительной компьютерной видеомикроскопии живых клеточных культур для исследования закономерностей формирования опухолевого фенотипа клеток и для разработки технологий антираковой терапии, которые направляют генетическую изменчивость раковых стволовых клеток в сторону пролиферативного ограничения и гибели. Полученные данные целесообразно учитывать для разработки методологии поиска новых высокоэффективных средств онкологической терапии и диагностики.

Список использованных источников

1. Шейко, Я.И. Генетически детерминированные изменения фенотипа клеток млекопитающих в стареющих и иммуортализированных клеточных популяциях: дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: 13.00.15 / Я.И. Шейко. – Минск, 2007. – 118 с.
2. Molecular Analysis of a Multistep Lung Cancer Model Induced by Chronic Inflammation Reveals Epigenetic Regulation of p16 and Activation of the DNA Damage Response Pathway / D. Blanco [et al.] // *Neoplasia*. – 2007. – Vol. 9, № 10. – P. 840.
3. Sunitinib Prolongs Survival in Genetically Engineered Mouse Models of Multistep Lung Carcinogenesis / L. Gandhi [et al.] // *Cancer Prevention Research*. – 2009. – Vol. 4, № 2. – P. 330–337.
4. Multistep pathogenesis of leukemia via the MLL–AF4 chimeric gene/Flt3 gene tyrosine kinase domain (TKD) mutation–related enhancement of S100A6 expression / H. Yamaguchi [et al.] // *Experimental hematology*. – 2009. – Vol. 37, № 6. – P. 701–705.
5. Hepatocarcinogenesis: multistep changes of drainage vessels at CT during arterial portography and hepatic arteriography–radiologic–pathologic correlation / A. Kitao [et al.] // *Radiology*. – 2009. – № 2. – P. 605–614.
6. Hino, O. Multistep renal carcinogenesis in the Eker (Tsc 2 gene mutant) rat model / O. Hino // *Current molecular medicine*. – 2004. – № 8. – P. 807.
7. Vincent, T.L. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis / T.L. Vincent, R.A. Gatenby // *International Journal of Oncology*. – 2008. – Vol. 32, № 4. – P. 729–737.
8. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2000. – Vol. 100. – P. 57–63.
9. Агеенко, А.И. Новая диагностика рака: теория, диагностика, лечение, реабилитация / А.И. Агеенко. – Москва: Медицина XX, – 2004. – 408 с.
10. Troshko, J.E. Cancer stem cells and cancer nonstem cells: from adult stem cells or from reprogramming of differentiated somatic cells // *Veterinary Pathology*. – 2009. – Vol. 46, № 2. – P. 180.
11. Frank, S.A. Dynamics of cancer: incidence, inheritance, and evolution / S.A. Frank. – Princeton: Princeton University Press; 2007. – P. 36–58.
12. Reddel, R. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis / R. Reddel // *Carcinogenesis*. – 2000. – Vol. 21, № 3. – P. 477.
13. Perryman, L.E. Animal models: Molecular

pathology of severe combined immunodeficiency in mice, horses, and dogs / L.E. Perryman // *Veterinary Pathology*. – 2004. – Vol. 41, № 2. – P. 95–97.

14. Expression profiles of SV40–immortalization–associated genes upregulated in various human cancers / H.M. Jung [et al.] // *Journal of Cellular Biochemistry*. – Vol. 106, № 4. – P. 703–705.

15. Jorgensen, M.K. The Influence of SV40 Immortalization of Human Fibroblasts on p53–Dependent Radiation Responses / M.K. Jorgensen, J. Timothy // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2002. – Vol. 257, № 1. – P. 168.

16. Knockdown of p53 combined with expression of the catalytic subunit of telomerase is sufficient to immortalize primary human ovarian surface epithelial cells / G. Yong [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2006. – Vol. 28, № 1. – P. 174.

17. C–myc Overexpression Causes Anaplasia in Medulloblastoma / D. Stearns [et al.] // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66, № 2. – P. 673.

18. Suri, C. The Immunohistochemical Evaluation Of The Expression Of Bcl–2 In Different Histological Grades Of Squamous Cell Carcinoma / C. Suri // *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. – 2009. – № 3. – P. 189.

19. Expression of activated M–Ras in hemopoietic stem cells initiates leukemogenic transformation, immortalization and preferential generation of mast cells / X.Guo [et al.] // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25, № 30. – P. 441.

20. The expression and significance of proto–oncogene c–fos in viral myocarditis / S.Zhang [et al.] // *Virology Journal*. – 2010. – Vol. 7, № 1. – P. 285.

21. Lele, R.D. Epigenetics – gene silencing / R.D. Lele // *The Journal of association of physicians of India*. – 2009. – Vol. 60. – P. 60.

22. Marusyk A. Tumor heterogeneity: Causes and consequences / A. Marushak, K. Polyak // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1805, № 1. – P. 105–117.

23. Genetic and epigenetic heterogeneity in cancer: the ultimate challenge for drug therapy / H.H. Heng [et al.] // *Current drug target*. – 2010. – № 10. – P. 304.

24. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype / K. Polyak [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2010. – Vol. 120, № 2. – P. 636–644.

25. Rubin, H. Cell–cell contact interactions conditionally determine suppression and selection of the neoplastic phenotype / H. Rubin // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, № 17. – P. 6215–6221.

26. Разработка клеточных тест–систем для создания полинуклеотидных антираковых препаратов / О.В. Квитко [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика*. – 2008. – Т. 7. – С. 18–19.

27. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice / J.Dick E. [et al.] // *Nature*. – 1994. – Vol. 367. – P. 645–648.

28. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells / M.F. Clarke [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100–107. – P. 3983–3988.

29. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy / J. Gil [et al.] // *Journal of Applied Genetics*. – 2008. – Vol. 49, № 2. – P. 193–199.

30. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis / Li Feng [et al.] // *Cell Research*. – 2006. – P. 1–12.

31. Cancer stem cells – old concepts, new insights / L. Vermeulen // *Nature: Cell Death and Differentiation*. – 2008. – Vol. 15. – P. 947–958.

32. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments / M.J.C. Handrix [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 7 – P. 248.

33. Биология стволовых клеток и клеточные технологии в 2 т. / под ред. М.А. Пальцева. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», издательство «Шико», 2009. – Т. 1. – С. 212.

34. Bypass of senescence, immortalization, and transformation of human hematopoietic progenitor cells / S.S. Akimov [et al.] // *Stem Cells*. – 2005. – Vol. 23. – P. 1423–1433.

35. Recurrence cancer stem cells – made by cell fusion? / T. Dittmar [et al.] // *Medical hypothesis*. – 2009. – Vol. 73, № 4. – P. 542.

36. Wurmser, A.E. Cell fusion causes confusion / A.E. Wurmser, F.H. Gage // *Nature*. – 2002. – Vol. 416. – P. 485–487.

37. Alvarez–Dolado, M. Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine/ M. Alvarez–Dolado // *Frontiers in Bioscience*. – 2007. – Vol. 12. – P. 1–12.

38. Fusion of bone–marrow–derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and he-

- patocytes / M. Alvarez-Dolado [et al.] // *Nature*. – 2003. – Vol. 425. – P. 968–973.
39. Cell fusion of bone marrow cells and somatic cell reprogramming by embryonic stem cells / S. Bonde [et al.] // *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2010. – Vol. 24. – P. 364–365.
40. Jordan, C.T. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells / C.T. Jordan, M.L. Guzman // *Oncogene*. – 2004. – Vol. 23. – P. 7178–7187.
41. Epigenetic codes in stem cells and cancer stem cells / Y. Yamada [et al.] // *Advances in genetics*. – 2010, Vol. 70. – P. 77–83.
42. Исследование роли аномальных митозов в процессе раковой трансформации / Я.И. Шейко [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика*. – 2008. – Т. 7. – С. 143–147.
43. Sell, S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy / S. Sell // *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. – 2004. – Vol. 51. – P. 1–28.
44. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications / M. Leszczyniecka [et al.] // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2010. – Vol. 90. – P. 105–115.
45. Simons J.W. Genetic, epigenetic, dysgenetic, and non-genetic mechanisms in tumorigenesis / J.W. Simons // *Critical Reviews in Oncogenesis*. – 1995. – Vol. 6, № 3–6. – P. 261–273.
46. Сапун, А.С. Витальная видеомикроскопия живых клеточных культур как метод анализа процессов иммуортализации и раковой трансформации / А.С. Сапун // *Биология: от молекулы до биосферы: материалы V Международной конференции молодых ученых, Харьков, 22–25 ноября, 2010 г.* / Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина; редкол: Л.И. Воробьева [и др.]. – Х.: «Оперативная полиграфия», 2010. – С. 64–66.
47. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains / L. Hayflick, P.S. Moorhead // *Experimental Cell Research* – 1961. – Vol. 25. – P. 177–185.
48. Компьютерная видеомикроскопия живых клеток / под ред. С.Е. Дромашко [и др.]. – Мн.: ИПНК, 2010. – 37 с.
49. Разработка методов компьютерной видеомикроскопии живых клеток для медицинской трансплантологии, биотехнологии животных и токсикологии / О.В.Квитко [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика*. – 2009. – Т. 10. – С. 89.
50. Hunting the mechanisms of self-renewal of immortal cell populations by means of real-time imaging of living cells / O.V. Kvitko [et al.] // *Cell Biology International*. – 2005. – Vol. 29. – P. 1019–1024.
51. Kvitko, O.V. Time-lapse microscopy of living cells in vitro / O.V. Kvitko, I.I. Koneva, Y.I. Sheiko // *Optical Techniques and Nanotools for Material and Life Sciences: Proceedings of the International Conference, Minsk, 15–19 June 2010.* / B.I. Stepanov Institute of Physics National Academy of Sciences of Belarus; editorial board: N.S. Kazak, Ch. Boller [et al.] – P. 220–223.

Дата поступления статьи 21 февраля 2011 г.

СТАБИЛЬНОСТЬ НАСЛЕДОВАНИЯ ВЕКТОРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С ГЕНОМ *cry3aM* В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ

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

Введение

В процессе создания трансгенных растений главное внимание уделяется получению трансформантов с высокой экспрессией целевого гена и стабильности его наследования. Уровень экспрессии трансгена обычно определяется методом ОТ-ПЦР или иммуноферментным анализом. Что же касается стабильности наследования целевого гена, то здесь требуется проводить анализ трансформантов в процессе семенного или вегетативного размножения как отбором на селективной среде, так и ПЦР-анализом. Стабильное наследование транс-

гена является необходимой предпосылкой для заключения об успехе применения генно-инженерных линий в последующем селекционном процессе.

В данной статье приводятся результаты исследования стабильности наследования генов созданных нами векторных систем в трансгенных растениях картофеля. В качестве целевого гена использовался *cry3aM* ген из *Bacillus thuringiensis*, белковый продукт которого проявляет инсектицидные свойства в отношении колорадского жука.

Материалы и методы

В работе использованы растения картофеля сорта Скарб. Для создания векторных экспрессионных систем был использован модифицированный *cry3aM* ген с оптимизированным кодонным составом для более эффективной экспрессии в растениях [1, 2, 3].

Методы трансформации и молекулярно-генетического анализа материала подробно изложены в предыдущих публикациях [3, 4].

Исследование сохранности гетерологичных генов в пробирочной культуре трансформантов картофеля изучали методом мультиплексной ПЦР [6]. Реакционная смесь для мультиплексной ПЦР содержала: 50 мМ KCl (рН

9,0); 0,1% тритон-X100; 2,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ каждого dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 5-10 пмоль каждого праймера; 150 нг геномной ДНК картофеля и 1 ед. акт. Taq-полимеразы (Силекс, Россия). ПЦР проводили в амплификаторе Peltier Thermal Cycler ("Bio-Rad", США) при следующих условиях 94°C – 5 мин; 94°C – 1 мин, 61°C – 1 мин, 72°C – 1 мин 30 сек (30 циклов); заключительная элонгация: 72°C – 4 мин. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Результаты геле-электрофореза документировали с помощью системы GelDoc 2000 ("Bio-Rad", США).

Результаты и обсуждение

В результате молекулярного клонирования созданы системы экспрессии гена *cry3aM* под управлением индуцируемого светом *rbcS* промотора малой субъединицы гена РБФК *Arabidopsis thaliana*, а также конститутивного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (*35SCaMV*). Используются

также последовательности, кодирующие лидерные пептиды, которые определяют разную локализацию генного продукта в клетке, а именно, последовательность лидерного пептида гена *rbcS* гороха – обеспечивает локализацию в хлоропластах растения и последовательность лидерного пептида экстенсина

моркови – локализация в межклеточном пространстве. Использование данных лидерных последовательностей предполагает более высокую доступность молекул токсина для процессирования и последующего связывания с рецепторами при попадании в кишечник насекомого.

В экспрессионных системах использована

также термостабильная лихеназа как транскрипционный репортер. Использование такого типа репортера значительно облегчает процедуру скрининга трансформантов с повышенным уровнем экспрессии, а также позволяет определять массу белка и его выход [7].

На рисунке 1 представлены схемы созданных экспрессионных систем.

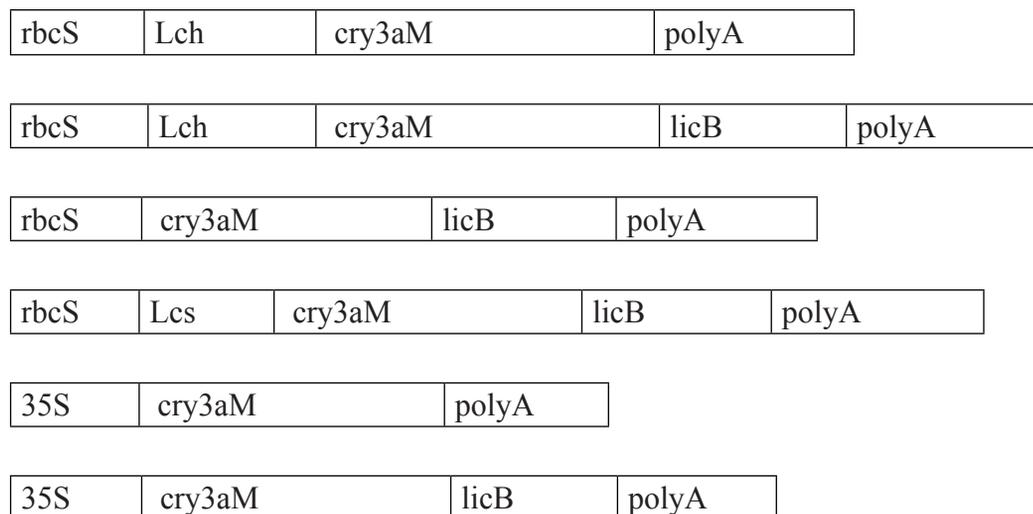


Рис. 1. Схема экспрессионных систем с геном *cry3aM*.

rbcS – светоиндуцибельный промотор малой субъединицы гена РБФК, *cry3aM* - модифицированный ген *cry3a*, *licB* - ген лихеназы, Lch – последовательность лидерного пептида гена *rbcS* гороха, Lcs – последовательность лидерного пептида гена экстенсина моркови, 35S – конститутивный промотор 35S РНК *CaMV*, polyA – область полиаденилирования.

Экспрессионные кассеты для *cry3aM* и *cry3aM-licB* генов под управлением светоиндуцибельного промотора *rbcS* созданы на основе вектора для экспрессии в растениях рс29 [8]. Для получения векторных молекул, в которых целевые гены находятся под контролем конститутивного промотора 35SCaMV, использовали плазмиду р135S-aroA (Институт общей генетики РАН).

Оба вектора несут селекционный маркер устойчивости к антибиотику канамицину *nrpII*. В результате проведения работы по молекулярному клонированию создано 6 оригинальных векторных конструкций, содержащих экспрессионные системы генов *cry3aM* и *cry3aM-licB* под управлением указанных выше регуляторных элементов.

Созданные вектора использованы для трансформации растений картофеля сорта Скарб

методом агробактериальной трансформации путем обработки листовых дисков суспензией *Agrobacterium tumefaciens* AGLO, содержащей соответствующие генетические конструкции.

Первичный отбор трансформантов проводили на среде, содержащей селективный агент – канамицин (50 мг/л). Отобранные на селективной среде регенеранты для подтверждения наличия в них целевого гена анализировали методом ПЦР и методом блот-гибридизации по Саузерну. Изучалась также экспрессия целевого гена методом ОТ-ПЦР, а также экспрессия гена лихеназы методом энзимогрaмм [7,9]. В результате были отобраны трансгенные растения по всем экспрессионным кассетам с относительно высокой экспрессией целевого гена *cry3aM*.

Линии растений-трансформантов, полученные от трансформации ДНК конструи-

ции *35S-cry3aM-licB* обозначены 35S-C-L, линии от трансформации ДНК конструкции *35S-cry3aM* названы 35S-C. От трансформации ДНК конструкцией *rbcS-Lch-cry3aM* и *rbcS-Lch-cry3aM-licB* полученные трансгенные линии названы RBCS-Lch-C и RBCS-Lch-C-L соответственно. Для конструкций *rbcS-cry3aM-licB* и *rbcS-Lsc-cry3aM-licB* линии трансформантов несут обозначения соответственно RBCS-C-L и RBCS-Lsc-C-L.

Успешная интродукция гетерологичных генов в настоящее время не представляет больших трудностей для многих растений. Однако введение в растительный геном чужеродной генетической информации не всегда обеспечивает стабильное фенотипическое проявление

и классическое менделевское наследование. Такая генетическая нестабильность может быть связана как с делецией или мутацией введенной ДНК, так и с инактивацией трансгена [10, 11, 12].

Для определения характера наследования целевых генов, а также выяснения расположения двух выявленных методом блот-гибридизации по Саузерну копий целевых генов в геноме модифицированных линий проводили скрещивание трансгенных линий картофеля с исходным сортом Скарб и самоопыление трансгенных линий с последующим анализом семян на устойчивость к канамицину. Результаты фенотипического расщепления по признаку устойчивости к канамицину приведены в таблице 1.

Таблица 1

Анализ расщепления популяции сеянцев по признаку устойчивости к канамицину

Линии растений	Количество семян ½ MS, шт.			Количество семян ½ MS + Km ₇₅ , шт.			Количество проростков на ½ MS + Km ₇₅ , шт.		Отношение res/sens проростков		Модель расщепления
	a	b	%	a	b	%	res	sens	Ф	Т	
82-2с	14	12,0	85,7±14,3	25	21,5	86,0±6,0	31	12	31:12	32:11*	3:1
86-2с	16	14,0	87,5 ± 8,9	25	19,5	78,0±7,3	28	11	28:11	29,5:9,5*	3:1
36-6с	19	15,5	81,6±2,6	25	21,5	86,0±2,0	41	2	41:2	40:3*	15:1
54-5 х Скарб	25	15,5	62,0±6,0	25	18,5	74,0±6,0	19	18	19:18	18,5:18,5*	1:1
155-1с	12	9,0	75,0±8,3	23	17	73,9±4,3	26	8	26:8	25,5:8,5*	3:1
161-1с	10	7,5	75,0±5,0	25	20,5	82,0±2,0	32	9	32:9	31:10*	3:1
15-3 х Скарб	16	12,0	75,0±12,5	25	19	76,0±4,0	0	38	0:38	-	-
16-6 х Скарб	22	15,0	68,2±4,5	25	18	72,0±8,0	16	20	16:20	18:18*	1:1
15-3с	14	3,0	21,4±14,3	25	9	36,0±4,0	0	18	0:18	-	-
38-3 х Скарб	17	17,0	100,0±0,0	25	24	96,0±0,0	26	22	26:22	24:24*	1:1
169-1с	19	14,5	76,3±7,9	24	19,5	81,3±6,3	31	8	31:8	29:10*	3:1

Примечание. а – высажено семян в каждой повторности; b- среднее количество проростков; res – устойчивые к канамицину проростки; sens – чувствительные к канамицину проростки; Ф – фактическое соотношение устойчивых и неустойчивых к канамицину проростков; Т – теоретически ожидаемое соотношение; после процентного показателя приведено отклонение среднего;

* - фактическое значение $\chi^2 > 3,841$ – гипотеза достоверна.

У растений четырех тестируемых линий (82-2, 155-1, 161-1, 169-1) наблюдаются расщепления близкие к 3:1, что является результатом самоопыления родительских растений. В результате анализирующего скрещивания родительских форм наблюдается ожидаемое расщепление 1:1. Эти данные согласуются с гипотезой моногенного наследования признака и соответствуют расщеплению симплексной гетерозиготы Аааа, что в данном случае является следствием интеграции одной или нескольких копий трансгена в одну гомологичную хромосому.

У линии 36-6 при самоопылении 41 проросток оказался устойчивым к канамицину и только 2 чувствительных, что можно объяснить расщеплением гетерозиготы по двум неаллельным генам 15:1 при полном доминировании. В случае линии 15-3 наблюдается отсутствие устойчивости к канамицину у всех проростков без исключения как при самоопылении, так и в результате скрещивания с исходным сортом. Данный феномен, возможно, обусловлен явлением сайленсинга.

Полученные данные, несмотря на различное количество вставок гетерологичной последо-

вательности и различное положение их в геноме растений, соответствуют схеме менделевского расщепления и могут служить основой для заключения о стабильном и предсказуемом характере наследования интегрированной в геном трансгенной вставки, содержащей гены *nptII* и *cry3aM*.

Созданная коллекция трансгенных растений картофеля поддерживалась в течение 3 лет в культуре *in vitro* на стандартной среде MS (Sigma) с добавкой хлор-холин-хлорида (70 мг/л) и селективного агента канамицина (50 мг/л). Пересадка на свежую среду производилась каждые 3-4 месяца. В этой связи представляло интерес изучить стабильность наследования целевого гена *cry3aM* и гена лихеназы в пробирочной культуре в течение 3 лет. Для анализа был использован метод мультиплексной ПЦР, разработанный в ИОГен РАН [6]. Данный метод позволяет за один раунд ПЦР провести эффективный скрининг трансформантов и выявить наличие последовательностей целевого, репортерного и селективного генов, а также оценить качество препарата выделенной геномной ДНК.

Пример результатов ПЦР-анализа представлен на рисунке 2.

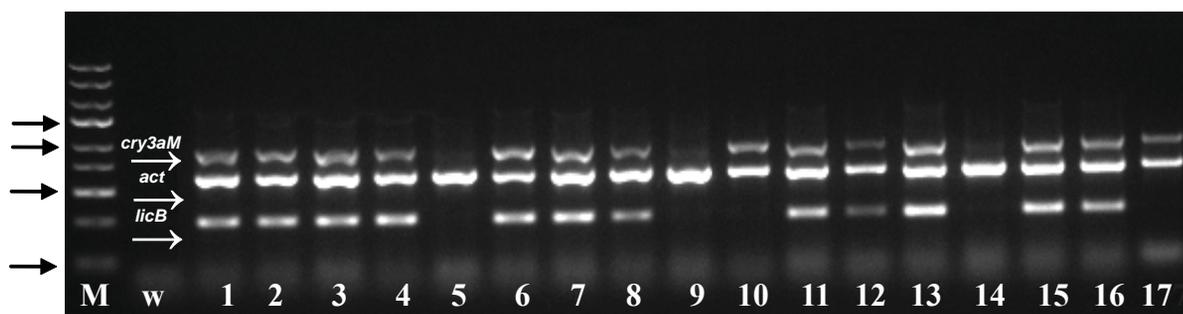


Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа растений картофеля поколения T_3 с геном *cry3aM*. М – маркер молекулярного веса GeneRuler Express DNA Ladder («Fermentas», Литва), w – контроль чистоты реакции (вместо проб ДНК взята вода), 1–17 – трансформанты картофеля.

Как видно из представленных на рисунке данных, не во всех образцах ДНК, выделенных из трансформантов картофеля, присутствуют последовательности всех исследуемых генов. В ряде образцов не обнаружены последовательности ни целевого (*cry3aM*), ни репортерного (*licB*) генов (дорожки 5, 9, 14). Однако, присутствие ПЦР-фрагмента гена домашнего хозяйства *act* свидетельствует о

хорошем качестве препарата ДНК.

В ряде образцов обнаружены последовательности целевого гена и гена домашнего хозяйства, но не обнаружена последовательность репортерного гена *licB* (дорожки 10 и 17). Мультиплексному ПЦР-анализу были подвергнуты 115 линий, представляющих все 6 экспрессионных кассет. Результаты анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2

Наличие трансгенов в трансгенных растениях картофеля после 3-х лет выращивания в культуре *in vitro*.

Экспрессионные кассеты	Варианты опыта	К-во линий	Линии, исходно содержащие гены		Линии, содержащие гены после культивирования <i>in vitro</i>				Линии, у которых отсутствуют оба гена (<i>cry3aM</i> и <i>licB</i>)	
			<i>cry3aM</i> , шт.	<i>licB</i> , шт.	<i>cry3aM</i>		<i>licB</i>			
					шт.	%	шт.	%	шт.	%
RBCS-Lch-C	1	9	9	-	9	100	-	-	-	-
RBCS-Lch-C-L	2	15	15	15	15	100	2	13,3	-	-
35S- C-L	3	25	25	25	19	76	15	60,0	5	20,0
35S-C	4	7	7		6	85,7	-	-	-	-
RBCS- C-L	5	30	30	30	26	76,7	23	76,7	4	13,3
RBCS-Lsc-C	6	29	29	29	23	79,3	21	72,4	6	20,6
Всего		115	115	99	98	85,2	61	61,6	15	15,2

Как видно из таблицы, в варианте 2 (RBCS-Lch-C-L) все 15 трансгенных линий сохранили целевой ген. В то же время репортерный ген лихеназы *licB* сохранился лишь у двух линий. В опыте 3 (35S- C-L) наблюдаются потери как целевого, так и репортерного гена, причем у 5 линий отсутствуют оба гена. Сходная картина наблюдается также в вариантах 5 (RBCS-Lsc-C) и 6 (RBCS-Lsc-C). В общей сложности по всем 6 вариантам опыта из 115 проанализированных линий целевой ген стабильно наследовался у 98 линий или у 85,2%. Репортерный ген лихеназы

сохранился у 61,6% трансгенных линий. У 15 линий (15,2%) не обнаружены оба гена.

Таким образом, из полученных данных следует, что длительное поддержание трансформированных растений в пробирочной культуре, их вегетативное размножение влияет на стабильность наследования трансгенов.

Проведенный анализ позволил эффективно проанализировать трансформанты картофеля и исключить из дальнейших экспериментов растения, не содержащие в геномной ДНК последовательностей перенесенных генов.

Список использованных источников

1. Salehi Jozani, G.R. Full modification of the coding sequence for enhancing potato expression of insect control protein *cry3a* gene/ G.R. Salehi Jozani, I.V. Goldenkova, E.S. Piruzan // Genetic variation for plant breeding: proceeding book of XVII European Association for Research on plant Breeding conference, Tulln, Austria, – 2004. – P. 239–245.
2. Салехи Джузани, Г.Р. Модификация последовательности гена *g-эндотоксина Bt var tenebrionis* для эффективной экспрессии в двудольных растениях // Г.Р. Салехи Джузани, К.А. Мусейчук // Актуальные проблемы генетики: материалы II конф. МОГИС им. Н.И. Вавилова, Москва, 20–21 февраля 2003г. / ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова, Вавиловское общество генетиков и селекционеров; редкол.: И.Ф. Жимулев [и др.] – Москва, 2003. – С. 112.
3. Экспериментальные модели для создания трансгенных растений, устойчивых к стрессовым факторам / И.В. Голденкова–Павлова, Е.В. Исаенко, Н. Мирахорли, А.Р. Маали, Н.А. Картель, Н.О. Юрьева, И.А. Абдеева // Цитология и генетика. – 2007. – № 3. – С. 44–49.
4. Исаенко, Е.В. Перенос гена *cry3aM* в геном растений картофеля / Е.В. Исаенко, И.В. Голденкова–Павлова, Н.А. Картель // Картофельводство: сб. науч. тр. / РУП науч. практи. Центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству; редкол. В.Г. Иванюк

[и др.] – Минск, 2007 – Т. 12. – С. 14–21.

5. Экспрессия и сайленсинг гетерологичных трансгенов *сгу3аМ* и *chiA* в картофеле белорусских сортов / Е.В. Исаенко, А.В. Шахбазов, А.С. Панюш, Н.А. Картель // Вестник Фонда фундаментальных исследований. – 2008. – № 3. – С. 36–41.

6. Berdichevets, I.N. Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants / I.N. Berdichevets [et all.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – V. 397. – P. 2289–2293.

7. Новая репортерная система, основанная на высокой термостабильности лихеназы для изучения регуляции экспрессии генов у растений / Э.С. Пирузян [и др.] // Физиология растений – 2000. – Т. 47. – № 3 – С. 382–389.

8. Plant expression vectors with the origin of replication of the W-type plasmid Sa / T. Allote

[et all.] // Plasmid – 1988. – V. 19. – P. 251–254.

9. Голденкова, И.В. Бифункциональные репортерные гены: конструирование и экспрессия в клетках про- и эукариот / И.В. Голденкова, К.А. Мусейчук, Э.С. Пирузян // Молекулярная биология – 2003. – № 37. – С.1–9.

10. Генетическая трансформация растений, процессы рекомбинации и регуляции экспрессии генов у трансгенных растений / Курочкина С.Д. [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология – 1988. – № 4. – С. 3–12.

11. Frequent occurrence of transgene deletion in transgenic plant / Kim Y.S. [et. all] // Mol. Cells – 1998. – V. 8. – P. 705–708.

12. Frequent spontaneous deletion of Ri T-DNA in *Agrobacterium* *rizogenes* transformed potato roots and regenerated plants / Hanish ten Cate C.H. [et. all] // Plant Mol. Biol. – 1990. – V. 14. – P. 735–741.

Дата поступления статьи 24 июня 2011 г.

О.В. Квитко, И.И. Конева, Я.И. Шейко, А.С. Сапун, Н.А. Балашенко, С.Е. Дромашко

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОМОЛОЖЕНИЕ КЛЕТОК И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА (обзорная статья)

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

Введение

Старение организма и составляющих его клеток остается нерешенной биологической проблемой, практическая важность которой демонстрируется исследованиями в области регенеративной медицины. Старение препятствует восстановительным процессам *in vivo*, а также продукции клеток *in vitro* с целью их прямого либо опосредованного (при создании искусственных органов) введения в организм.

В результате клеточного старения, основой которого является накопление ряда эпигенетических нарушений, ведущих к дисбалансу экспрессии генома, ослабляются регенеративные процессы, а также уменьшается репликативный потенциал иммунологически безопасных собственных (аутогенных) клеток при размножении *in vitro*. Культивируемые клетки, лишенные совокупности питательных и регуляторных факторов внутриорганизменной среды, как правило, стареют быстрее, чем в организме, что ограничивает наработку клеток для клеточной терапии и тканевой инженерии. С другой стороны, при неограниченной пролиферации *in vitro* клетки могут трансформироваться в направлении ракового фенотипа. Поддержание нормального функционирования клеток, тканей и организма в целом является результатом регуляторного баланса, «дорогой по лезвию бритвы» между старением и онкотрансформацией.

Для разработки средств противодействия клеточному старению особую ценность имеет возможность не только замедления накапливаемых эпигенетических нарушений, но и их восстановления (репарации). Ряд данных указывает на существование механизмов эпи-

генетического омоложения, которые не ассоциированы с раковым перерождением клеток. Изучение этих механизмов открывает перспективу создания методов восстановления нарушений клеток *in vivo*, а также разработки технологий производства клеточных препаратов для заместительной терапии.

В работе представлен анализ материалов экспериментальных и теоретических исследований, связанных с поиском средств эпигенетического омоложения соматических клеток в целях разработки методов регенеративной медицины. Приведены аргументы в пользу сопряженности механизмов эпигенетического омоложения с процессами развития и роста организма. Рассмотрена роль метилирования ДНК, модификаций гистоновых белков хроматина, а также сокращения и восстановления длин фланкирующих хромосомы теломерных гексануклеотидных ДНК-повторов в процессах накопления и репарации нарушений, являющихся основой клеточного старения. Обобщены связанные с проблемой сведения о стимулировании восстановления теломер *in vivo* и *in vitro*. Проанализированы данные об увеличении пролиферативного потенциала клеток посредством транзиторной (временной) активизации введенной в клетки конструкции, включающей ген теломеразы. Изложен также опыт исследований авторов по получению спонтанных иммортализованных клеточных линий и компьютерной видеомикроскопии живых клеток, который может быть основой развития экспериментальных моделей для разработки средств эпигенетического омоложения культивируемых клеток.

Заместительная клеточная терапия и регуляторные средства противодействия старению

Имеющиеся в распоряжении медицины средства продления жизни и поддержания ее качества основаны преимущественно на борьбе с болезнями, вызываемыми старением, а не на вмешательстве в сам процесс старения [1]. Однако без существенных успехов в замедлении старения даже полное устранение смертности, связанной с зависимыми от возраста болезнями, может продлить среднюю продолжительность жизни лишь в относительно небольших пределах [2]. Современные методы профилактики и терапии возрастной патологии, по-видимому, являются лишь тактически ограниченными внутривидовой генотипической вариацией долговечности, в то время как стратегические средства продления жизни, способные преодолевать ее видовой предел, остаются недоступными [3]. Следовательно, по мере увеличения средней долговечности, но без увеличения ее максимального видового лимита (120 – 130 лет) все в большей степени обесценивается внедрение новых медицинских технологий, направленных на лечение частных болезней. Таким образом, без теоретического понимания старения и нахождения средств преодоления видового предела продолжительности жизни весь комплекс медико-биологических наук с точки зрения практики может оказаться в тупике. Поэтому представляется уместным сожаление Леонарда Хайфлика о том, что лишь относительно малая часть работ, объединенных под рубрикой «исследования по старению», направлена на изучение старения как такового [2].

В связи с перспективами клеточной трансплантологии [4], а также со значительным прогрессом в изучении столовых клеток возникает вопрос о том, может ли заместительная клеточная терапия явиться средством преодоления видового предела продолжительности жизни человека.

Клеточная и тканевая трансплантация в перспективе может быть использована для замены поврежденных травмами или болезнью участков тканей или даже целых органов. Вполне вероятно, что в случае успеха этот подход внесет свою уникальную лепту в лечение ряда заболеваний. Однако при старении нарушают-

ся функции различных элементов организма. Поэтому для увеличения максимальной долговечности, в принципе, потребовалась бы не локальная трансплантация отдельных частей, но глобальная замена практически всех органов и систем. Кроме того, такая массивная трансплантация должна быть, в принципе, многократной, поскольку трансплантируемые органы, даже если они состоят из молодых клеток, снова будут стареть. Следовательно, вряд ли тотальная и многократная трансплантация является более реалистичным средством продления максимальной продолжительности жизни по сравнению с еще не разработанными средствами функциональной регуляции, замедляющими старение организма в целом.

Вместе с тем, открытие эффективных регуляторных методик противодействия старению вовсе не обесценит другие направления профилактики и лечения, включая клеточную и тканевую трансплантацию. Напротив, необходимость их развития только возрастет. Дело в том, что биорегуляторные средства, системно замедляющие процессы старения, вряд ли сами по себе окажутся достаточными для значительного увеличения продолжительности жизни. Для реализации нового, увеличенного потенциала долговечности потребуются комплекс дополнительных методов, среди которых особая роль может принадлежать заместительной клеточной и тканевой терапии. В пользу такого взгляда свидетельствует то, что успехи медицины и санитарной гигиены в XX веке резко уменьшили смертность от причин, не связанных со старением (например, смертность от инфекционных болезней), и тем самым позволили в значительной степени реализовать существующий видовой предел долговечности, приблизив к нему среднюю продолжительность жизни. Однако, смертность, не связанная со старением и являющаяся по отношению к старению случайной (accidental death), в принципе не может быть полностью исключена. Поэтому при увеличении биологического предела долговечности, например, в 10 раз, т.е. до 1200 – 1300 лет, вовсе не произойдет автоматическое увеличение средней продолжительности жизни

(например, до 700-800 лет). В результате резкого увеличения потенциала долговечности с помощью найденных в будущем биорегуляторных средств, замедляющих процесс старения, снова приобретет остроту необходимость уменьшения вероятности случайной смерти. При этом значительно расширятся перспективы «тактических» медицинских технологий (включая заместительную клеточную терапию), позволяющих предотвращать смертность от причин, не связанных со старением. Ведь предельная эффективность таких технологий будет ограничена не десятками (как в настоящее время), а столетиями активных лет человеческой жизни.

В пользу целесообразности поиска средств замедления самого процесса старения наряду с развитием технологий заместительной клеточной терапии свидетельствует возможная незаменимость неделящихся нейронов в качестве хранителей индивидуальной памяти. Поэтому замена по крайней мере некоторых нейронов новыми клетками может быть недопустима. Это обусловлено тем, что новые нейроны, генерируемые в процессе нейрогенеза из внесенных при трансплантации стволовых клеток, не будут обладать информацией, накопленной старыми нейронами. Поскольку нейроны, подобно другим нормальным клеткам, подвержены старению, то именно незаменимые нейроны, будучи носителями индивидуальной памяти, станут слабым звеном, причиной смерти (если не физической, то духовной, что применительно к человеку практически равносильно) даже при полном обновлении остальных клеток тела за счет клеточных технологий. Вполне вероятно, что именно по этой причине у наиболее сложных видов (включая человека), обладающих большой продолжительностью жизни, процесс нейрогенеза у взрослых организмов вовсе не является более интенсивным по сравнению с менее долговечными видами. По-видимому, у сложных и долговечных организмов продолжительное функционирование мозга обеспечивается преимущественно не интенсивной заменой постаревших нейронов за счет нейрогенеза, а особыми механизмами, противодействующими процессу старения индивидуальных нейронов. В этой связи наряду с разработкой методов клеточной транспланта-

ции особый смысл приобретает поиск средств, способных замедлить старение неделящихся, постмитотических клеток, таких как нейроны. О перспективе такого поиска свидетельствует, в частности, восстановление сенсорных функций нейронов мозга стареющих обезьян под влиянием инъекций малых концентраций нейротрансмиттера гамма-аминобутировой кислоты (GABA) [5]. Эти данные можно объяснить тем, что стареющие неделящиеся нейроны обладают способностью к восстановлению функций, но этот омолаживающий механизм приводится в действие под влиянием внешних по отношению к клетке сигналов, в данном случае передаваемых при посредстве нейромедиатора GABA.

Перспективное направление поиска способов замедления старения связано с изучением естественных механизмов поддержания функционирования клеток в организме. Эти механизмы, в частности, могут быть опосредованы межклеточной регуляцией, осуществляемой вырабатываемыми клетками сигнальными молекулами – такими, как разнообразные факторы роста. В этом плане представляет интерес публикация в журнале *Nature*, в которой исследовались омолаживающие эффекты гетерохронного парабиоза, т.е. стимулирование функций старого животного путем хирургического совмещения его кровообращения с кровеносной системой молодого организма [6]. Парабиоз между молодыми и старыми мышцами активизировал сигнальную систему гена *Notch* и обеспечивал усиление пролиферации и регенерационной способности в сателлитных (стволовых) клетках мышц и печени. Сыворотка крови из молодых мышечных активизировала сигнальную систему *Notch* и усиливала пролиферацию сателлитных клеток при их культивировании *in vitro*.

Следовательно, культура клеток позволяет осуществлять поиск «омолаживающих» гуморальных факторов. В то же время в организме по сравнению с культурой клеток должны существовать более совершенные регуляторные механизмы, противодействующие старению. Такие механизмы могут быть связаны с эволюционно отработанной пространственно-временной организацией сигнальных процессов. В этой связи вызывают интерес данные о том, что временные осцилляции биохими-

ческих сигналов, воспринимаемых клеткой, важны для регуляции генной экспрессии. Так, в Т-лимфоцитах транскрипция генов ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) и ядерного фактора каппа В (NF kappa B) изменялась под воздействием определенных ча-

стот осцилляций концентрации поступающего в клетки кальция [7]. Эти результаты ведут к предположению о существовании особых регуляторных кодов, передаваемых частотами концентрационных осцилляций сигнальных веществ и дешифруемых клетками.

Сопряженность механизмов эпигенетического омоложения с процессами развития и роста

Уменьшение в межклеточной среде концентрационных флуктуаций сигнальных молекул после завершения физического развития и роста организма может быть основной причиной старения [8;9]. В соответствии с этой идеей (получившей название «развитийная теория омоложения») в развивающемся и растущем организме сигнальная ситуация является более динамичной по сравнению с взрослым организмом, завершившем рост. Сопряженные с развитием и ростом временные колебания концентраций информационных молекул обладают достаточной амплитудой для того, чтобы достигать регуляторного порога и включать программу омоложения – восстановления физиологически оптимального для данной дифференцировки эпигенотипа клетки, то есть спектра активности генов. В частности, вследствие регуляторной плейотропии (когда одна и та же молекула участвует в разных сигнальных путях) сигнальные белки, называемые морфогенами, могут наряду с морфогенетическими функциями стимулировать теломеразу и восстановление физиологически оптимальной генной экспрессии посредством регулирования процессов модификации ДНК (метилирование цитозина) и хромосомных гистонов.

В поддержании и изменении клеточного эпигенотипа особую роль выполняют процессы модификации ДНК и гистоновых белков хроматина. Основной механизм модификации ДНК – метилирование цитозина, в то время как гистоновые белки подвергаются ацетилированию, метилированию, фосфорилированию и другим процессам, модулирующим активность хромосомных генов [10]. Следовательно, каскад молекулярных событий, запускаемый межклеточными омолаживающими ритмическими сигналами, должен завершаться регуляцией работы ряда ферментов, осуществляющих модификацию ДНК и белков.

К таким детерминирующим клеточный эпигенотип ферментам могут, в частности, относиться ДНК-метилтрансфераза и гистоновая деацетилаза [11].

Молекулярные механизмы межклеточных сигналов в эмбриональном развитии были открыты в результате исследований, стимулированных опубликованной в 1924 г. работой Спеманна об эмбриональной индукции, завершившейся созданием «теории организаторов в эмбриональном развитии», за которую в 1935 г. Спеманну была присуждена нобелевская премия по физиологии и медицине [12].

По современным представлениям организаторы в эмбриогенезе – это группы клеток, которые секретируют в межклеточную среду коктейль морфогенов – ростовых факторов и их антагонистов, совокупное действие которых индуцирует формирование определенных тканей и органов. Известно несколько семейств морфогенов (включая Wnt, Notch, Hedgehog, FGF и TGF-beta). Молекулы морфогенов соединяются со специфическими рецепторами на клеточной поверхности, после чего сигналы при участии ряда внутриклеточных белков достигают ядра и модифицируют генную экспрессию. Различные направления дифференцировки клеток в разных частях эмбриона определяются изменяющимся во времени пространственным распределением концентраций морфогенов. При этом клетка реагирует не просто на пороговую концентрацию, а на «историю экспозиции» [13], то есть пространственно-временные градиенты морфогенов на уровне индивидуальной клетки воспринимаются в виде упомянутых выше временных концентрационных осцилляций.

В пользу идеи о том, что колебания концентраций морфогенов не только организуют морфогенез в растущем организме, но одновременно служат сигналами антистарения,

свидетельствуют данные о регуляторной плеiotропии факторов роста. Один и тот же ростовой фактор может не только индуцировать дифференцировку, но также стимулировать пролиферацию и обеспечивать выживание клетки [14]. Одной из причин такой плеiotропии является способность одного и того же фактора роста присоединяться более чем к одному типу трансмембранных рецепторов [14]. Следовательно, в принципе морфогенные белки могут использоваться для регуляции ряда функций и во взрослом организме. Действительно, различные морфогенетические белки обнаруживаются не только в эмбриогенезе, но и в тканях взрослого человека [15]. Индуктивная способность данного тканевого организатора затухает спустя некоторое время после завершения управляемой стадии развития. Однако по мере появления новых тканей формируются вторичные организаторы, которые также функционируют в течение определенного срока и обеспечивают дальнейшие этапы морфогенеза [16]. Является ли необратимой утрата генерации морфогенетических сигналов? Возможно, для сохранения индуктивной способности организаторов необходимы стимулирующие воздействия ранее сформировавшихся организационных центров. В то же время в процессе эмбриогенеза предшествующие организаторы могут либо исчезать, либо утрачивать активность из-за исчезновения еще более ранних центров. Кроме того, если даже самый первый по времени формирования организатор не исчезает при последующих тканевых перестройках, то его активность не может быть постоянной из-за отсутствия предшествующего организатора. В результате любая численно ограниченная иерархия организаторов постепенно утрачивает активность. Однако не исключено, что организаторы сами по себе сохраняют индуктивный потенциал, который может быть реализован при возобновлении соответствующих стимулирующих сигналов.

Отсюда следует предположение, что ткани взрослого организма “унаследовали” от эмбриона большое количество “молчащих организаторов”, то есть групп клеток, потенциально способных продуцировать межклеточные пространственно-временные градиенты морфогенов, которые по своим

частотно-амплитудным характеристикам сходны с градиентами в тканях эмбриона. Восстановление характерной для эмбриона ритмической продукции морфогенов было бы равносильно повторному запуску сопряженных с эмбриогенезом сигналов антистарения, стабилизирующих физиологически оптимальный репертуар активности генов. При этом были бы реализованы только позитивные аспекты восстановленной морфогенной сигнализации, обеспечивающие омолаживание клеток, поскольку изменение ритмики морфогенов по эмбриональному типу не привело бы к нежелательным побочным эффектам, вызванным нарушением клеточной дифференцировки. Ведь еще в работах Спеманна было показано, что собственно морфогенетическая реактивность тканей строго ограничена во времени. В то же время механизмы эпигенетического омоложения, основой которого является восстановление оптимального для данной ткани спектра активности генома, могут активизироваться в любое время под влиянием адекватных внеклеточных сигналов.

Имеющиеся работы по генетике продолжительности жизни не дают ответа на вопрос о причинах неполной репарации эпигенетических нарушений, поскольку не удается объяснить огромную межвидовую вариацию продолжительности жизни, включая феномен видов с пренебрежимо медленным старением (*negligible senescence*). Ведь резкие контрасты в продолжительности жизни разных видов могут быть обусловлены яркими различиями в эффективности репарации эпигенетических ошибок. Однако к настоящему времени значительные успехи достигнуты только в понимании детерминации относительно небольших колебаний срока жизни индивидуумов в пределах вида. В то же время механизмы, являющиеся основой на порядки более масштабного межвидового диапазона долговечности, практически не изучены. Применяв метафору, можно сказать, что исследователи пока заняты анализом травинки у себя под ногами, не замечая деревьев над головой.

Такая ситуация обусловлена тем, что для изучения внутривидовой вариации темпов старения применим экспериментальный подход, основанный на поиске и анализе работы генов, мутации в которых влияют на темп старе-

ния. Замедляющие старение и продлевающие жизнь мутации часто повышают резистентность к стрессам, обусловленную усилением ряда процессов, включая антиоксидантную защиту, деградацию поврежденных белков с помощью шаперонов и репарацию ДНК. Важен вывод об эволюционном консерватизме геронтогенов. Например, инсулиноподобный сигналинг у млекопитающих в целом сходен с регуляцией метаболизма глюкозы у дрожжей [17]. Однако огромные межвидовые различия в скорости старения не могут быть объяснены эволюционным усилением защиты от стрессов. В то же время, согласно развитой теории омоложения, замедление старения в эволюции происходило в основном не путем изменчивости геронтогенов, а благодаря «автоматическому» продлению работы особого процесса восстановления (репарации) эпигенетических нарушений при увеличении периода развития и роста организма.

Сопряженный с ростом механизм омоложения может также (возможно, в синергизме с уменьшением свободнорадикального повреждения макромолекул и горметическим эффектом умеренного стресса) обеспечивать замедление старения и продление жизни крыс при ограничении количества пищи (caloric restriction), приводящему к значительному продлению периода роста, обнаруженному в классических экспериментах Маккея [18].

Эпигенетическое ревертирование возрастных нарушений при наличии необходимой морфогенетической регуляции может сохраняться и после завершения роста тела. Кроме того, сопряженный с развитием и ростом механизм эпигенетического омоложения должен отличаться от механизма поддержания иммортализации популяций раковых клеток

[19]. Возможно, например, что индуцируемое морфогенами восстановление оптимальной геномной экспрессии происходит в постмитотических клетках и в интерфазе делящихся клеток (включая стволовые), причем этот процесс не связан с абберрантными изменениями регуляции клеточного цикла, вовлеченными в процесс эпигенетического омоложения раковых клеток. С этой точки зрения при использовании культуры клеток для поиска воздействий, замедляющих или ревертирующих старение, но не сопряженных с повышением ракового риска, целесообразно применять модель стационарного старения неделящихся клеток, используемой в работах А.Н. Хохлова [20]. При этом для изучения динамики изменений отдельных клеток представляется перспективной применяемая нами непрерывная компьютерная видеомикроскопия живых клеточных культур [19]. Кроме того, с точки зрения идеи об особой регуляторной роли флуктуаций действующих факторов наряду с поиском веществ, замедляющих старение, особый интерес представляет изучение эффектов электромагнитных полей, позволяющих, по сравнению с «вещественными» факторами, в гораздо большей степени варьировать параметрами флуктуирующих воздействий. Для культур клеток это особенно важно, поскольку в них, по сравнению с организмом, намного меньше возможностей для образования регулярных пространственно-временных градиентов. Значение исследований влияния электромагнитных полей на культивируемые клетки подкрепляется открытием явления ориентированной миграции клеток к катоду или аноду электрического поля, обладающего параметрами поля, возникающего при заживлении ран [21].

Разработка методов эпигенетического омоложения *in vivo* и *in vitro*

Особым направлением поисков средств замедления клеточного старения на уровне организма является исследование возможности психологического воздействия на процесс накопления эпигенетических нарушений. К ним, наряду с метилированием ДНК и модификациями гистонов, целесообразно относить предсказанное Оловниковым явление маргинотомии - сокращение теломерной ДНК,

фланкирующей хромосомы, происходящее при каждом делении клеток в отсутствие активности фермента теломеразы [22]. В этом плане представляют особый интерес исследования объединенного коллектива молекулярных генетиков и психологов, среди которых была Элизабет Блэкбурн, получившая в 2009 году Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие процессов, впервые с

удивительной детальностью изложенных в теоретической работе Оловникова. Так, в работе [23] обобщены результаты исследований по влиянию психологических процессов на длину теломера в соматических клетках человека на примере лимфоцитов крови. В частности, исследованы эффекты одной из форм медитативной техники, а именно «mindfulness meditation» (при данной форме медитации внимание сосредоточено на текущем моменте, включая окружающую реальность, а также субъективные ощущения). Установлено, что «медитация текущего момента» снижает психологический стресс и способствует сохранению теломерной ДНК посредством активизации теломеразы. Авторы полагают, что омолаживающие эффекты измененных состояний сознания на теломеры могут быть опосредованы изменениями нейроэндокринной регуляции, в частности, повышением активности вагусного нерва, усилением продукции андрогенов, а также понижением уровней инсулина и гормона стресса кортизола [23]. В свою очередь, с позиций развитой теории омоложения, благоприятные нейроэндокринные изменения могут повышать в тканях взрослого организма продукцию морфогенетических молекул (морфогенов), восстанавливая сигнальную ситуацию, характерную для растущего организма (рис. 1). Морфогены, свою очередь, стимулируют системы восстановления эпигенетических нарушений в клетках организма, включая не только длины теломерных гексануклеотидных повторов (TTAGGG)_n, но и спектр метилирования ДНК и модификаций гистонов хроматина.

Таким образом, особый практический интерес приобретает разработка новых способов управления сознанием, которые по своей эффективности (включая аспект эпигенетического омоложения клеток организма) превосходят существующие психологические методики. В соответствии с развитой теорией омоложения для эффективной генерации омолаживающих сигналов мозг должен достичь состояния развитой доминанты [8; 9; 24]. Измененная в данном состоянии нейроэндокринная сигнализация может возбуждать характерные для растущего организма флуктуации морфогенов в тканях напрямую (посредством нервных окончаний) или опосредованно, модулируя ритмику продукции гормонов железами

внутренней секреции. Состояние развитой доминанты, одновременно обеспечивающее совершенствование информационного процессинга в мозге и генерацию омолаживающих сигналов, может быть достигнуто новым способом медитативной техники. Известные светские и религиозные варианты медитации (включая «медитацию текущего момента») основаны на достижении необычных состояний сознания с помощью концентрации внимания на некоторых мыслях. Предлагаемая развитая медитация, напротив, не ограничивает, а расширяет фокус сознания (включая как «обыденные», так и «трансцендентные» компоненты), что тренирует способность мозга оперировать одновременно возрастающим объемом разнообразной информации. Эту психологическую технику можно охарактеризовать девизом «думай сразу обо всем» - «think of everything simultaneously» [24].

Разработка методов эпигенетического омоложения клеток (как стволовых, так и дифференцированных) *in vitro* – необходимая предпосылка для широкого внедрения аутогенной (иммунологически толерантной) клеточной трансплантации в медицину. В этом плане представляется перспективным поиск режимов временной (транзиторной) иммортализации, при которой после периода репарации накопленных нарушений стимулирующее воздействие прекращается с целью недопущения необратимой иммортализации в направлении ракового фенотипа. При этом клетки эпигенетически омолаживаются, но после отмены стимула не трансформируются, а начинают стареть, после чего на каком-то этапе снова производится омолаживающее воздействие, и т.д. Иными словами, омолаживающий стимул дается клеткам не постоянно, а в определенном, экспериментально подобранном прерывистом режиме.

В пользу идеи временной иммортализации свидетельствуют данные работы о том, что транзиторная экспрессия гена каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) продлевает продолжительность жизни культивируемых нормальных диплоидных фибробластов человека [25]. В этой работе использовали рекомбинационную систему Cre/lox. Ретровирусную конструкцию, содержащую кДНК hTERT, фланкированную loxP-сайтами, ввели в поста-

ревшие фибробласты при удвоении клеточной популяции (УКП) 85. После достижения УКП 92, которое превышает типичную продолжительность жизни данных клеток, введенный ген hTERT был вырезан посредством Cre-опосредованной рекомбинации. В результате все клеточные клоны утратили теломеразную активность и проявили сокращение теломер, но временной экспрессии теломеразы (в течение 7 УКП) оказалось достаточно для дополнительных 50 УКП.

На наш взгляд, для реализации идеи транзиторной иммортализации клеток *in vitro* может быть пригодной не только техника с генетическими конструкциями (повышающими риск необратимой трансформации), но и модифицированная методика спонтанного получения постоянных (иммортализованных) клеточных линий. В наших исследованиях были

получены постоянные линии клеток из фолликулов волос человека и гранулезы яичника коров [26; 27], а также из эмбриональных фибробластов мыши [19; 28] и человека. При получении постоянных линий мы использовали методику продолжительного культивирования клеток без трипсиновых пересевов, заменяемых периодической сменой питательной среды. Представляется целесообразным с целью поиска режима культивирования, ведущего не к конститутивной, а к транзиторной (обратимой) иммортализации, использовать периодические рассевы клеток при меньшей плотности. При этом для определения сроков пересева можно использовать мониторинг характеристик клеточных культур, осуществляемый с помощью разрабатываемых нами методов компьютерной видеомикроскопии живых клеток [19; 28].

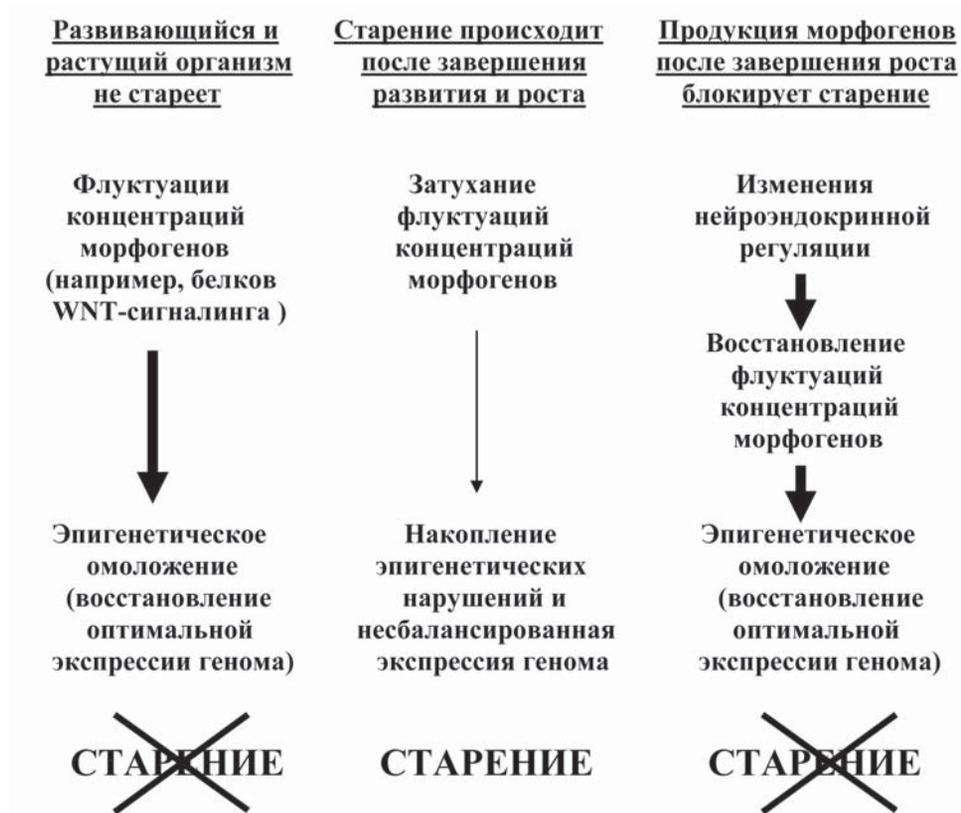


Рис. 1. Сопряженный с процессами развития механизм эпигенетического омоложения и его стимулирование после завершения роста посредством изменений нейроэндокринной регуляции.

Заключение

Условием успешного применения клеточных технологий в медицине является поиск методов противодействия процессам старения клеток *in vivo* и *in vitro* на основе эпигенетического омоложения, не связанного со злокачественной трансформацией и включающего восстановление физиологически оптимальных спектра метилирования ДНК, модификаций гистонов хромати-

на и длин теломерных гексануклеотидных ДНК-повторов, фланкирующих хромосомы. Изучение механизмов, управляющих репарацией накапливающихся с возрастом эпигенетических нарушений, открывает перспективу создания методов восстановления нарушений клеток *in vivo*, а также разработки технологий производства клеточных препаратов для заместительной терапии.

Список используемых источников

- Hayflick, L. "Anti-aging" is an oxymoron. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2004. – Vol. 59, N. 6. – P. 573–578.
- Hayflick L. The future of ageing. // *Nature*. – 2000. – Vol. 408, N. 6809. – P. 267–269.
- Квитко, О.В. Что останется непонятым в старении, если будут открыты редусомы. // *Цитология* 2004. – Т. 46, № 7. – С. 660–666.
- Берсенева, А.В. Клеточная трансплантология – история, современное состояние и перспективы. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2005, № 1. – С. 49–56.
- Miller, G. Old neurons revisit their youth. // *Science* 2003. – Vol. 300. – P. 721–722.
- Conboy I.M., Conboy M.J., Wagers A.J., Girma E.R., Weissman I.L., Rando T.A. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. // *Nature*. – 2005. – Vol. 433, N. 7027. – P. 760–764.
- Lewis, R.S. Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – Vol. 31. – P. 925–929.
- Квитко, О.В. Старение – результат постразвитийного дефицита антистохастических сигналов, стабилизирующих гомеостаз. // *Клиническая геронтология* 2003. – Т. 9, № 9. – С. 165.
- Квитко, О.В. Развивающаяся доминанта как механизм антистарения. // *Альманах геронтологии и гериатрии* 2005, Вып. 4. – С. 73–77.
- Geiman T.M., Robertson K.D. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation – how does it all fit together? // *J. Cell. Biochem.* – 2002. – Vol. 87, N. 2. – P. 117–125.
- Hellebrekers, D.M., Castermans K., Vire E., Dings R.P., Hoebers N.T, Mayo K.H., Oude Egbrink M.G., Molema G., Fuks F., van Engeland M., Griffioen A.W. Epigenetic regulation of tumor endothelial cell anergy: silencing of intercellular adhesion molecule-1 by histone modifications. // *Cancer Res.* 2006. – Vol. 66, N. 22. – P. 10770–10777.
- Sander, K., Faessler P.E. Introducing the Spemann–Mangold organizer: experiments and insights that generated a key concept in developmental biology. // *Int. J. Dev. Biol.* 2001. – Vol. 45, N. 1. – P. 1–11.
- Umulis D.M., Serpe M, O'connor MB, Othmer HG. Robust, bistable patterning of the dorsal surface of the *Drosophila* embryo. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2006. – Vol. 103, N. 31. – P. 11613–11618.
- Bottcher R.T., Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. // *Endocr. Rev.* 2005. – Vol. 26, N. 1. – P. 63–77.
- Blazsek, I. Innate chaos: I. The origin and genesis of complex morphologies and homeotic regulation. // *Biomed. Pharmacother.* 1992. – Vol. 46. – P. 219–235.
- Meinhardt H. Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. // *Dev. Biol.* 1983. – Vol. 96, N. 2. – P. 375–385.
- Barbieri, M., Bonafe M., Franceschi C., Paolisso G. Insulin/IGF-I–signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 285. – P. 1064–1071.
- McCay C., Crowell M., Maynard L. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size // *J. Nutr.* 1935. – Vol. 10. – P. 63–79.

19. Kvitko O.V., Koneva I.I., Sheiko Y.I., Anisovich M.V. Hunting the mechanisms of self-renewal of immortal cell populations by means of real-time imaging of living cells // *Cell Biol. Int.* – 2005. – Vol. 29. – P. 1019–1024.
20. Хохлов А.Н., Прохоров Л.Ю., Акимов С.С., Шиловский Г.А., Щеглова М.В., Сорока А.Е. «Стационарное старение» клеточных культур: попытка оценки влияния «возраста» среды // *Цитология.* 2005. – Т. 47. – С. 318–322.
21. Zhao M., Song B., Pu J., Reid B., Tai G., Wang F., Guo A., Walcysko P., Gu Y., Suzuki A., Forrester J.V., Bourne H.R., Devreotes P.N., McCaig C.D., Penninger J.M. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase- γ and PTEN // *Nature.* 2005. – Vol. 442. – P. 457–460.
22. Olovnikov, A.M. A theory of marginotomy. // *J. Theor. Biol.* – 1973. – Vol. 41. – P. 181–190.
23. Epel E., Daubenmier J., Moskowitz J., Folkman S., Blackburn E. Can meditation slow rate of cellular aging? Cognitive stress, mindfulness, and telomeres // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 1172. – P. 34–53.
24. Kvitko, O. Developmental theory of rejuvenation. // *The Journal of Nutrition, Health & Aging.* – 2009. – Vol. 13. – Suppl. 1. – P. 389.
25. Steinert S., Shay J.W., Wright W.E. Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. – Vol. 273. – P. 1095–1098.
26. Квитко О.В., Конева И.И., Шейко Я.И., Трусова В.Д., Шевцова С.Н., Балашенко Н.А., Сапун А.С., Дромашко С.Е. Разработка методов компьютерной видеомикроскопии живых клеток для медицинской трансплантологии, биотехнологии животных и токсикологии. // *Молекулярная и прикладная генетика.* – 2009. – Т. 10. – С. 89–100.
27. Ганджа А.И., Леткевич Л.Л., Симоненко В.П., Кириллова И.В., Конева И.И., Квитко О.В., Шейко Я.И. Получение эмбрионов *in vitro* с использованием монослоя клеток гранулезы // *Зоотехническая наука Беларуси.* – 2009. – Т. 44, Часть 1. – С. 20–27.
28. Шейко Я.И., Квитко О.В., Конева И.И., Дромашко С.Е. Исследование роли аномальных митозов в процессе раковой трансформации. // *Молекулярная и прикладная генетика.* – 2008. – Т. 7. – С. 143–147.

Дата поступления статьи 11 апреля 2011 г.

РЕФЕРАТЫ

SUMMARIES

УДК 575.2+576.312.32

Кунах, В.А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений / В.А. Кунах // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 7-14.

Изложены взгляды и предположения автора, сформулированные в результате анализа как литературных данных, так и многолетних собственных исследований генома растений в различных условиях произрастания. Обосновывается три ключевых положения. Первое. Любая соматическая клетка растения с живым (функционально активным) ядром при выращивании в условиях культуры тканей вследствие процессов «сомаклональной» изменчивости, происходящей в рамках закона гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Вавилова, может восстановить в своих потомках, в том числе среди растений-регенерантов, генетический полиморфизм (по крайней мере, значительную его часть) своего вида, а возможно, даже и рода растений. Второе. Растение – это система клеточных популяций, которая характеризуется пластичностью своего генофонда, что при взаимодействии с клеточным отбором обеспечивает адаптивность растения как целостного организма и создает возможность наследования (передачи потомкам) адаптивных геномных изменений, приобретенных в течение онтогенеза. Третье. Ключевую роль в обеспечении пластичности генома (регуляции его изменчивости в соматических клетках), в определении типа, направленности и жесткости «естественного» отбора, действующего в клеточной популяции, а также в интеграции клеточных популяций в целостный организм играет гормональная система растения.

Ключевые слова: геном растений, пластичность генома, адаптивность растений

Kunakh, V. Genome plasticity of somatic cells and plant adaptability / V.A. Kunakh // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 7-14.

Author's views and assumptions formulated as a result of analysis of both literature data and long-term own investigations of plant genome under different growth conditions have been set forth. Three statements were substantiated: The first one. Any plant somatic cell harboring the living (functionally active) nucleus upon its culturing under tissue culture conditions is capable to restore the species genetic polymorphism (at least its considerable part) and perhaps even that of plant genus in its progeny, including regenerant plants due to "somaclonal" variability processes occurring within the range of the "Law of homologous series in hereditary variation" by N.I. Vavilov. The second. Plant is a system of cell populations which is characterized by plasticity of its gene pool that under interaction with cell selection ensures adaptability of plant as an integral organism and creates the possibility of inheriting (transfer to progeny) adaptive genome changes acquired during ontogenesis. The third. The plant hormonal system plays a key role in providing genome plasticity (regulation of its variability in somatic cells), in determining type, trend and severity of "natural" selection affecting the cell population as well as in integrating cell populations into the holistic organism.

Key words: plant genome, genome plasticity, plant adaptability

УДК 633[111+“324”]:575.16

Стельмах, А.Ф. Разнообразие генотипов современных сортов озимой мягкой пшеницы по потребности в яровизации и фоточувствительности / А.Ф. Стельмах, В.И. Файт // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 15-18.

Большинство сортов озимой мягкой пшеницы СГИ последних десятилетий характеризуются слабой фоточувствительностью вследствие использования в селекционных программах полукарликовых доноров фотонейтральности. Однако это сократило их потребность в яровизации с 55-60 до 40-45 суток, что повысило угрозу повреждения всходов при условиях суровой перезимовки. Оценка физиологических параметров и генетический анализ подобных сортов показали возможность удлинения потребности в яровизации путем замены доминантных *Vrd* аллелей на их рецессивные аналоги при сохранении генофона по слабой фоточувствительности. Для условий юга степи Украины генотип *Vrd2 Ppd-B1a* более оптимально сочетает потенциал урожая и зимостойкость. В последние годы среди селекционных линий уже идентифицируются и подобные генотипы.

Ключевые слова: озимая мягкая пшеница, яровизация, фоточувствительность, генотипы, эффекты

Stelmakh, A. Variety of genes of modern winter bread wheat cultivars for requirement in vernalization and photosensitivity / A. Stelmakh, V. Fayt // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 15-18.

The majority of last decade PBGI cultivars of winter bread wheat are characterized by weak photosensitivity due to a wide use of the semi-dwarf donors of photoin sensitivity in breeding programs. However this has shortened their requirement in vernalization from 55-60 to 40-45 days increasing the danger of seedling injury during rigorous wintering. Evaluation of physiological parameters and genetic analysis have shown the possibility of extending the requirement in vernalization by substitution of dominant *Vrd* alleles by their recessive analogues under maintaining gene pool for

weak photosensitivity. The *Vrd2 Ppd-B1a* genotype combines more optimum the yield potential and winter hardiness for Ukrainian southern steppe conditions. In recent years such genotypes are already indentified among breeding lines.

Key words: winter bread wheat, vernalization, photosensitivity, genotypes, effects

УДК 575.174:575.113:577.27

Разработка универсального метода оценки генетического разнообразия и паспортизации пород и популяций domestцированных видов животных / Г.Е. Сулимова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 19-27. Соавт: Кол Н.В., Рузина М.Н., Столповский К.Ю., Воронкова В.Н., Бояринцева И.С., Столповский Ю.А.

Предложен метод оценки генетического разнообразия и паспортизации пород и популяций domestцированных видов животных на основе модифицированного межмикросателлитного анализа ДНК (ISSR-фингерпринтинга) в сочетании с обработкой данных с использованием программы STRUCTURE 2.2. Продемонстрирована универсальность данного подхода. Одни и те же праймеры могут быть использованы для анализа генетического разнообразия различных видов животных: крупного рогатого скота, яков, верблюдов, овец, коз, свиней, соболей и др. Оценена информативность различных типов ISSR-маркеров. Показано, что предлагаемый подход позволяет проводить дифференциацию пород, стад и линий у всех видов сельскохозяйственных животных. Ценность метода заключается также в том, что он позволяет выявлять чистопородных и помесных животных в исследуемых популяциях. Таким образом, метод ISSR-фингерпринтинга может быть предложен как высокоэффективный инструмент для дифференциации и паспортизации пород, стад и линий domestцированных животных, оценки их генетического разнообразия, что особенно важно при чистопородном разведении животных и проведении работ по восстановлению и сохранению редких и исчезающих пород.

Ключевые слова: ДНК-маркеры, генетическое разнообразие, межмикросателлитный анализ ДНК, domestцированные животные, паспортизация пород

Development of the universal method for estimation of genetic diversity and certification of domesticated animal species and populations / G.E. Sulimova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 19-27. Kol N., Rusina M., Stolpovsky K., Voronkova V., Boyarintseva I., Stolpovsky Yu.

The approach of estimating genetic diversity and certifying breeds and populations of domesticated animal species was proposed on the basis of the modified ISSR-fingerprinting in combination with data processing with STRUCTURE 2.2 program. Universality of the given approach was shown. The same primers can be used for analyzing genetic diversity of various animal species: cattle, yak, camel, sheep, goat, pig, sable, etc. Informativity of various ISSR-marker types was estimated. It is shown that the proposed approach allows differentiation of breeds, herds and lines in all the species of agricultural animals. The value of the proposed method consists also in the fact that it allows detection of purebred and crossbred animals in the populations under study. Thus, ISSR-fingerprinting can be proposed as a highly effective tool for differentiation and certification of species, herds and lines of domesticated animals and estimation of their genetic diversity. It is especially important at thoroughbred animal improvement and work on restoration and preservation of rare and vanishing species.

Key words: DNA-markers, genetic diversity, DNA intermicrosatellite analysis, domesticated animals, breed certification

УДК 575.22:577.21:633.413

Свирщевская, А.М. Анализ RAPD спектров сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) и оценка возможностей использования метода для идентификации ее форм / А.М. Свирщевская, Л.В. Милько, А.В. Кильчевский // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 28-40.

На разных по объему и составу выборках образцов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) были испытаны 10 случайных коротких олигонуклеотидных праймеров и из них отобраны 5 наиболее эффективных для получения полиморфных геномных RAPD профилей. При использовании проб в виде смеси образцов ДНК растений доля полиморфных локусов среди общего количества детектируемых составляла более 30 %, а различия были обнаружены даже между геномами близкородственных генотипов. Для линий сахарной свеклы разного происхождения и уровня пloidности отмечена достоверная кластеризация генотипов по уровню пloidности, отличного от диплоидного (гаплоидов, тетраплоидов). Уровень полиморфизма RAPD локусов в спектрах 80 растений, представляющих 5 популяций (4 линии и 1 сорт сахарной свеклы), превышал 50 %. Данные молекулярной вариации AMOVA для этих изученных популяций указывают на высокую внутривнутрипопуляционную изменчивость и сложную структуру популяции линейного и сортового материала. Выявление уникальных фрагментов амплификации и высокий уровень полиморфизма локусов в спектрах, полученных с помощью эффективных праймеров, подтверждают возможность использования метода RAPD для генотипирования линий сахарной свеклы.

Ключевые слова: сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.), RAPD маркеры, геномная идентификация

Svirshchevskaya, A. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) RAPD spectra analysis and assessment of possibilities to utilize the method for germplasm identification / A. Svirshchevskaya, L. Milko, A. Kilchevsky // Molecular and Applied

Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 28-40.

Ten random short oligonucleotide primers were tested in samples of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) accessions of different size and composition. Out of them five, the most effective for producing polymorphic genomic RAPD profiles, were selected. When using DNA bulk samples (mixture of DNA specimens), the amount of polymorphic loci out of the detected ones exceeded 30%, and differences even between closely related genotypes were revealed. In sugar beet lines of diverse origin and ploidy level, significant genotype clusterization was noted for the ploidy level different from the diploid one (haploids, tetraploids). The level of RAPD loci polymorphism in spectra of 80 plants representing 5 sugar beet populations (4 lines and 1 cultivar-population) exceeded 50%. The analysis data of AMOVA molecular variance for the 5 studied populations point to high intrapopulation variability and population structure complexity in sugar beet line and cultivar germplasm. Unique amplified DNA fragments identification and a high level of loci polymorphism in spectra, developed with applied efficient primers confirm the possibility of RAPD method utilization for sugar beet lines genotyping.

Key words: sugar beet (*Beta vulgaris* L.), RAPD markers, genome identification

УДК 631.523.11:582.751.42

Гузенко, Е.В. Создание и анализ генетически модифицированных растений льна (*Linum usitatissimum* L.), несущих мутантный ген тубулина, методом агробактериальной трансформации / Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 41-48.

Проведена трансформация льна-долгунца с помощью *Agrobacterium tumefaciens* плазмидой pBITUB8, содержащей мутантный ген α -тубулина, обеспечивающий устойчивость к динитроанилиновым гербицидам, и селективный маркерный *nptII*- ген, обеспечивающий устойчивость к канамицину. Селекцию трансформантов льна осуществляли параллельно на средах, содержащих канамицин и трифлуралин (динитроанилиновый гербицид). Трансгенная природа полученных регенерантов, устойчивых к динитроанилиновым гербицидам, была подтверждена ПЦР-методом со специфическими праймерами к 35S промотору CaMV, *nptII* гену и хромосомным генам агробактерии.

Guzenko, Ye. Development and analysis of genetically modified flax plants (*Linum usitatissimum* L.) carrying mutant tubulin gene by agrobacterial transformation method / Ye. Guzenko, V. Lemesh // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 41-48.

Agrobacterium tumefaciens was used to transform fiber flax with the pBITUB8 plasmid carrying the mutant α -tubulin gene imparting resistance to dinitroaniline herbicides and the *nptII* selective marker gene imparting resistance to canamycin. The transformants were in parallel on media containing canamycin and trifluralin (a dinitroaniline herbicide). The transgenic nature of the resultant regenerants resistant to dinitroaniline herbicides was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) analysis using specific primers for the 35S-promoter CaMV, the *nptII* gene and *Agrobacterium* chromosome genes.

УДК 604.6:635.21

Савчин, Д. В. Генетическая трансформация растений векторными конструкциями с геном *gox* *Penicillium funiculosum* / Д.В. Савчин, А.С. Панюш, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 49-55. С

Растения, экспрессирующие глюкозооксидазу, характеризуются повышенной устойчивостью к некоторым бактериальным и грибным патогенам. В статье рассмотрен процесс создания векторных конструкций с геном глюкозооксидазы *P. funiculosum* (*gox*) для трансформации растений. Описаны методы получения трансгенных растений картофеля и табака. Получены линии трансгенных растений, экспрессирующих глюкозооксидазу, что было доказано методом ПЦР и проверкой активности фермента. Полученные линии растений будут использованы для дальнейших исследований.

Ключевые слова: трансгенные растения, глюкозооксидаза, *P. funiculosum*, пероксид водорода

Sauchyn, D. Plant genetic transformation using vectors with *gox* *Penicillium funiculosum* gene / D. Sauchyn, A. Panyush, N. Kartel // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 49-55.

Plant defense responses to pathogen infection involve production of active oxygen species, including hydrogen peroxide. Methods of transgenic plant development and vector construction were described. Transgenic potato and tobacco plants expressing a fungal gene encoding glucose oxidase, which generates H₂O₂ when glucose is oxidized, were produced. The glucose oxidase gene (*gox*) was cloned from *P. funiculosum*. The transgenic plants were tested by PCR and glucose oxidase enzyme activity assay. The transgenic plant lines will be used in further investigations.

Key words: transgenic plants, glucose oxidase, *P. funiculosum*, hydrogen peroxide

УДК 604.6:635.21

Идентификация гена *Val* среди сортов и образцов яблони различного генетического происхождения, выращиваемых в Беларуси / О. Ю. Урбанович [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 56-63. Соавт.: Козловская З.А., Васеха В.В., Кузмицкая П.В., Картель Н.А.

С помощью молекулярного маркера Vf2ARD, сцепленного с геном *Rvi17(Va1)*, проведено тестирование 128 сортов и видов яблони различного генетического происхождения, выращиваемых на территории Беларуси, а также 157 гибридов. Маркерный фрагмент был выявлен в геноме сортов Антоновка обыкновенная, Антоновка стаканчатая могилевская, Белорусский синап, Вербнае, Коваленковское, Коробовка крупноплодная, Лошицкое, Новинка осени, Память Пашкевича, Пепин литовский улучшенный, Freedom, Чаравница. Ген идентифицирован также у 9 клонов Антоновки, собранных в разных садах Беларуси и отличающихся по морфологическим признакам. Отмечена высокая диагностическая ценность маркера Vf2ARD. Выявлены гибридные сеянцы, полученные на основе сорта Чаравница, содержащие гены устойчивости к парше *Rvi6(Vf)* и *Rvi17(Va1)*. Они отличаются высокой полевой устойчивостью к парше в эпифитотийные годы. Объединение в одном генотипе двух высокоэффективных генов обеспечивает стабильно высокую устойчивость к парше.

Ключевые слова: яблоня, молекулярные маркеры, гены устойчивости, парша яблони, ген *Rvi17(Va1)*

Identification of gene *Va1* among apple cultivars and accessions of different genetic origin grown in Belarus / O. Urbanovich [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 56-63. Kozlovskaya Z., Vaseha V., Kuzmitskaya P., Kartel N.

Testing of 128 apple cultivars and species of different genetic origin grown in the Belarus area as well as 157 hybrids was carried out by means of the molecular marker Vf2ARD linked with the gene *Rvi17(Va1)*. A marker fragment was revealed in genome of the cultivar Antonovka obyknovennaya, Antonovka stakanchataya mogilevskaya, Belorussky sinap, Verbnae, Kovalenkovskoye, Korobovka krupnoplodnaya, Loshitskoye, Novinka oseni, Pamyat Pashkevicha, Pepin litovsky uluchenny, Freedom and Charavnitsa. The gene was also identified in 9 clones of the cv. Antonovka collected in various gardens in Belarus and distinguished by morphological traits. A high diagnostic value of the marker Vf2ARD was noted. Hybrid seedlings produced on the basis of the cv. Charavnitsa containing scab resistance genes *Rvi6(Vf)* and *Rvi17(Va1)* were detected. They are distinguished by high field resistance to scab in epiphytoty years. Combination of two high-effective genes in one genotype ensures steadily high resistance to scab.

Key words: apple, molecular markers, resistance genes, apple scab, *Rvi17(Va1)* gene

УДК 577.21:575:616.62-006.6

Полиморфизмы генов эксцизионной репарации ДНК при раке мочевого пузыря / Н.В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 64-74. Соавт.: Смаль М.П., Романюк О.П., Кузир Т.Д., Гончарова Р.И.

Представлен обзор данных о системах и функциях эксцизионной репарации ДНК. Обсуждается вклад полиморфизма генов эксцизионной репарации ДНК в риск канцерогенеза, а также роль полиморфных аллелей генов эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований ДНК как биомаркеров предрасположенности к раку мочевого пузыря.

Ключевые слова: эксцизионная репарация нуклеотидов, эксцизионная репарация оснований, полиморфизмы генов, рак мочевого пузыря

Polymorphisms of DNA excision repair genes in bladder cancer / N. Savina [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 64-74 // Smal M., Ramaniuk O., Kuzhir T., Goncharova R.

Review of the data on DNA excision repair systems and their functions is presented. Contribution of genetic polymorphisms in the excision repair pathways to cancer risk as well as the role of allele variants in base excision repair and nucleotide excision repair as biomarkers of a bladder cancer predisposition is discussed.

Key words: nucleotide excision repair (NER), base excision repair (BER), gene polymorphisms, bladder cancer

УДК 579.8.06:663.18

Бажанов Д.П. Типирование флуоресцирующих псевдомонад с помощью рестрикционного анализа межгенного 16S–23S рРНК спейсера. / Д.П. Бажанов, К.К. Яцевич // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12, Минск, 2011. С. 75-79.

На основании рестрикционного анализа межгенного 16S–23S рРНК спейсера проведено типирование двенадцати штаммов флуоресцирующих псевдомонад из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (БИМ). Кластерный анализ выявил среди исследуемых штаммов генотипические группы, степень родства внутри которых позволяла относить входящие в них бактерии к одному и тому же геномовиду. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования рестрикционного анализа межгенного 16S–23S рРНК спейсера в таксономических исследованиях бактерий рода *Pseudomonas* с целью получения дополнительной генотипической характеристики для дифференциации близкородственных видов.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, риботипирование, кластерный анализ, таксономия.

Bazhanov D.P. Typing of fluorescent pseudomonads by restriction analysis of the intergenic 16S-23S rRNA spacer / D. Bazhanov, K. Yatsевич // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 75-79.

Twelve strains of fluorescent pseudomonads from the Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms were typed by restriction analysis of the intergenic 16S-23S rRNA spacer. Cluster analysis revealed genotype groups among the investigated strains, the affinity degree within which allowed attribution of the clustered bacteria to the same genome type. The obtained results indicated applicability of this method in taxonomic studies of the bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* for differentiation of closely related species.

Key words: Pseudomonas, ribotyping, cluster analysis, taxonomy

УДК 635.65 (089) : 631.523 : 631.527.52

Выявление генетического разнообразия коллекции зернобобовых ВИР посредством RAPD-маркирования образцов / М.А. Вишнякова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 80-89. Соавт.: Бурляева М.О., Буравцева Т.В., Соболев Д.В., Алпатьева Н.В.

Изложены результаты RAPD-маркирования коллекционного генофонда зернобобовых ВИР, предварительно изученных по ряду морфологических и агрономических свойств. У образцов фасоли, формирующих серии с одинаковым названием (дублеты) и поступивших в коллекцию в разное время, выявлено наличие как истинных дублетов, так и генетически разного материала, что свидетельствует о невозможности признания его дублетами только на основе фенотипического сходства. Анализ 95 образцов гороха не выявил RAPD-фрагментов, характерных для сортов, но позволил классифицировать их по направлениям использования: зернового, кормового и овощного. При генотипировании представителей 51 видов из 4 родов трибы *Vicieae* Bronn выявлен ряд мономорфных фрагментов, специфичных для трибы, трех родов, ряда видов и некоторых секций рода *Lathyrus*. Это позволило уточнить целый ряд спорных таксономических вопросов трибы: о статусе отдельных видов, о структуре секций рода *Lathyrus*, о позиции в системе так называемых оробидных видов *Vicia* и *Lathyrus*.

Ключевые слова: коллекция гермплазмы, дублеты, таксономия, генетический полиморфизм, RAPD-анализ

Detection of genetic diversity in the collection of grain legumes of Vavilov Institute by means of RAPD-marking of accessions / M. Vishnyakova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 80-89. Burlyaeva M., Buravtseva T., Sobolev D., Alpatyeva N.

The results of RAPD-marking of grain legumes collection of Vavilov Institute are given. The accessions preliminarily have been studied for a number of morphological and agronomic traits. The analysis of accessions of common beans, which form a series with the same name (doublets) and introduced into the collection at different times, revealed the presence of true doublets and genetically different material. This fact indicates the impossibility of recognizing them as doublets only on the basis of phenotypic similarities. An analysis of 95 accessions of peas did not show RAPD-fragments characteristic of varieties, but allowed their classification in accordance with the directions of use: seed, fodder and vegetables. Genotyping of representatives of 51 species from 4 genera of the *Vicieae* Bronn tribe allowed detection of monomorphic fragments specific for the tribe, three genera, many species and some sections of the genus *Lathyrus*. Some controversial taxonomic issues of the tribe have been clarified: the status of several individual species, the structure of the genus *Lathyrus* sections, and the position of the so-called oroboid species of *Vicia* and *Lathyrus* in the system.

УДК 599.323.4:576.3151.316

Полиморфизм хромосомных рас обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus*, Insectivora) Беларуси / Ю.М. Борисов [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 90-99. Соавт.: Бахарев В.Н., Черепанова Е.В., Спрингер А.М., Каштальян А.П., Борисова З.З., Мижуй С.М., Орлов В.Н.

На территории Беларуси выявлено 7 хромосомных рас обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus* L.) (Западная Двина, Борисов, Лепель, Туров, Бобруйск, Киев, Беловеж). Все популяции обыкновенной бурозубки Беларуси полиморфны по Робертсоновским транслокациям хромосом ($2n=18-28$, в кариотипах присутствуют от 0 до 10 пар акроцентриков из 10 возможных для вида *S. araneus*) в отличие от популяций, распространенных северо-восточнее, для которых характерны мономорфные почти полностью метацентрические кариотипы. Предполагается, что на территории современной Беларуси в позднем плейстоцене обитали популяции *S. araneus* с 10 парами акроцентрических хромосом. В послеледниковье и в раннем голоцене обыкновенные бурозубки с акроцентрическими кариотипами вступили в контакт с расами, в кариотипах которых преобладали метацентрические хромосомы. В результате гибридизации между «метацентрическими» расами и автохтонной «acroцентрической» расой возникли полиморфные популяции с различной частотой метацентрических хромосом. Изучение разных по происхождению полиморфных популяций обыкновенной бурозубки на территории Беларуси позволяет проследить уникальный процесс хромосомной микроэволюции данного вида.

Ключевые слова: обыкновенная бурозубка *Sorex araneus*, хромосомный полиморфизм, хромосомные расы, зоны контакта и гибридизации

Polymorphism of chromosome races in common shrew (*Sorex araneus*, Insectivora) in Belarus / Yu. Borisov

[et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 90-99. Bakharev V., Cherepanova E., Springer A., Kashtal'an A., Borisova Z., Mizhuy S., Orlov V.

Seven chromosome races of the common shrew (*Sorex araneus* L.) were revealed in Belarus area: the Zapadnaya Dvina, Borisov, Lepel, Turov, Bobruysk, Kiev, and Bialowieza. All populations of the common shrew in Belarus are polymorphic in Robertsonian chromosome translocations ($2n=18-28$, karyotypes include 0 to 10 acrocentric pairs out of 10 possible for *S. araneus* species) in contrast to populations occurring frequently northeast of Belarus which are characterized by monomorphic almost completely metacentric karyotypes. It is supposed that *S. araneus* populations with 10 pairs of acrocentric chromosomes inhabited the territory of the present-day Belarus in late Pleistocene. The common shrews with acrocentric karyotypes and races with metacentric chromosomes prevailing in karyotypes came to contact in postglaciation and early Holocene. Polymorphic populations with different frequency of metacentric chromosomes originated as a result of hybridization between "metacentric" races and autokhtonic "acrocentric" race. While studying the polymorphic populations of *S. araneus* of different origin we can observe a process of chromosomal microevolution of this species.

Key words: common shrew *Sorex araneus*, chromosome polymorphism, chromosome race, zones of contact and hybridization

УДК 575.174.015.3:633.16:577.21

Полиморфизм хлоропластных локусов ячменя из центров генетического разнообразия / Н.В. Луханина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2010. С. 100-107. Соавт.: Синявская М.Г., Голоенко И.М., Поморцев А.А., Давыденко О.Г.

Исследован полиморфизм 4 локусов хлоропластного генома стародавних сортов ячменя из предполагаемых центров происхождения с использованием микросателлитных маркеров. Выделено 10 гаплотипов, из них 3 редких, выявлены их доли. Показан более высокий уровень изменчивости хлоропластных геномов стародавних сортов ячменя по сравнению с современными. По результатам кластерного анализа частот гаплотипов образцы из Эфиопии, Йемена и Ирака попадают в один кластер, что говорит о генетической связи ячменей Эфиопии, Южной Аравии и Юго-Западной Азии.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*, хлоропластный геном, молекулярные маркеры, центры генетического разнообразия

Polymorphism of barley chloroplast loci from the genetic diversity centres / N. Lukhanina [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2010. P. 100-107. Siniauskaya M., Goloenko I., Pomortsev A., Davydenko O.

Polymorphism of 4 chloroplast DNA loci of barley landraces from the supposed centers of origin was studied using microsatellite markers. Ten haplotypes were selected, of them 3 were rare, with their portions being revealed. A higher level of chloroplast genome variability in ancient barley cultivars as against the modern ones was shown. Cluster analysis of haplotype frequencies indicates that the accessions from Ethiopia, Yemen and Iraq find themselves in one cluster that points to the genetic relation between barley varieties from Ethiopia, South Arabia and South - West Asia.

Key words: *Hordeum vulgare*, chloroplast genome, molecular markers, centers of genetic diversity

УДК 636.2.082.22

Михайлова, М.Е. Сравнительный анализ генетической структуры белорусских популяций крупного рогатого скота черно-пестрой и голштинской пород по полиморфным вариантам генов соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bPrl*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*) / М.Е. Михайлова, Е.В. Белая, Н.М. Волчок // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 108-114.

Впервые проведен сравнительный анализ частот встречаемости полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада, а именно полиморфизмы *bPit-1-HinFI*, *bPit-1-StuI*, *bPrl-RsaI*, *bGH-AluI*, *bGHR-SspI* и *bIGF-1-SnaBI* в выборках популяций голштинской и черно-пестрой пород, разводимых в Республике Беларусь. Отмечено, что для всех исследованных полиморфизмов редкий аллель, выявленный в популяции черно-пестрой породы, также является редким и в популяции голштинской породы. Выявлены статистически значимые различия по *AluI*-полиморфизму гена гормона роста *bGH*, так частота редкого аллеля *bGH-AluI V* в популяции черно-пестрого скота в 5,7 раза выше, чем в популяции голштинской породы.

Ключевые слова: Генетическая структура, полиморфизм, гипофизарный фактор роста-1, гормон роста, рецептор гормона роста, инсулиноподобный фактор роста-1, пролактин

Mikhailova, M. Comparative analysis of genetic structure in Belarusian populations of White-and-black and Holstein cattle for polymorphic gene variants of somatotropin cascade (*bPit-1*, *bPrl*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*) / M. Mikhailova, Ye. Belaya, N. Volchok // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 108-114.

Comparative analysis of occurrence frequencies of polymorphic gene variants of somatotropin cascade, viz. polymorphisms *bPit-1-HinFI*, *bPit-1-StuI*, *bPrl-RsaI*, *bGH-AluI*, *bGHR-SspI* and *bIGF-1-SnaBI*, was first carried out in samples of Holstein and White-and-black breeds reared in the Republic of Belarus. It was noted that a rare allele revealed in the

White-and-black breed population is also rare in the Holstein breed population for all the analysed polymorphisms. Statistically significant differences in *AIuI*-polymorphism of *bGH* growth hormone gene were revealed. So, the frequency of the rare *bGH-AIuI V* allele in the White-and-black cattle population was 5.7 times as high as in the Holstein breed population.

Key words: genetic structure, polymorphism, pituitary growth factor-1, growth hormone, growth hormone receptor, insulin-like growth factor-1, prolactin

УДК 636.2.082.22

Взаимосвязь признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота с (-1689) полиморфизмом гена альфа-лактальбумина (α -LA) / М.Е. Михайлова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 115-118. Соавт.: Волчок Н., Норис Роа, Карин Дрешер.

Изучен (-1689) полиморфизм гена α -LA, проведен анализ генетической структуры популяций КРС по данному локусу α -LA, определены частоты ценного аллельного варианта А в различных хозяйствах РБ. Показана положительная корреляция А аллеля с общим удоем, а также возможность практического использования метода ПЦР-диагностики КРС по гену α -LA в маркер-зависимой селекции, направленной на увеличение удоя.

Ключевые слова: Генетическая структура, полиморфизм, частоты аллелей, альфа-лактальбумин, молочная продуктивность, крупный рогатый скот

Relationship between milk productivity traits of cattle and (-1689) polymorphism of alpha-lactalbumin (α -LA) gene / M. Mikhailova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 115-118. Volchok N., Noris Roa, Karin Dresher.

The authors have studied (-1689) polymorphism of α -LA gene, made analysis of the genetic structure in cattle populations for this α -LA locus and determined the frequencies of the valuable A allele variant in various farms in the Republic of Belarus. A positive correlation of A allele to the total yield of milk as well as the possibility of practical application of cattle PCR-diagnostics method for α -LA gene in marker-assisted selection aimed at an increase in milk yield is shown.

Key words: genetic structure, polymorphism, allele frequencies, alpha-lactalbumin, milk productivity, cattle

УДК 616–006.48:615.28

Иммортализация и онкотрансформация в популяциях соматических клеток / А.С. Сапун [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 119-129. Соавт.: Квитко О.В., Конева И.И., Шейко Я.И., Балашенко Н.А., Дромашко С.Е.

Опухоли представляют собой гетерогенные образования, прогрессирующие во времени путем приобретения генетических и эпигенетических изменений. Раковая трансформация является сложным процессом, механизм которого до сих пор остается неизученным. Исследование многоэтапности иммортализации и онкотрансформации является актуальной фундаментальной и прикладной задачей, решение которой представляется важным для понимания природы злокачественного роста и разработки новых методов антираковой терапии. Дальнейший прогресс в этой области возможен при выполнении исследований на уровне отдельных клеток и клеточных клонов в живых клеточных культурах человека или млекопитающих, что обеспечивается таким эффективным экспериментальным подходом как компьютерная видеомикроскопия живых клеточных культур. В работе впервые описаны закономерности изменений клеточной популяции эмбриональных фибробластов человека в процессе иммортализации. Установлено, что интенсивно пролиферирующие веретенновидные клетки являются ранним этапом иммортализации. В дальнейшем в некоторых местах ростового субстрата происходит дифференцировка веретенновидных клеток в округлые. Детальная количественная оценка соотношения редких мутационных и массовых эпигенетических изменений в процессе иммортализации клеток может быть выполнена с помощью параллельной автоматизированной видеосъемки многих участков клеточной культуры.

Ключевые слова: раковая трансформация, иммортализация, компьютерная видеомикроскопия

Immortalization and oncotransformation in somatic cell populations / A. Sapun [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 119-129. Kvitko O., Koneva I., Sheiko Ya., Balashenko N., Dromashko S.E.

Tumors are highly heterogeneous formations progressing in time by acquiring genetic and epigenetic changes. Cancer transformation is a multistage process a cellular mechanism of which has been studied insufficiently yet. Investigation of immortalization and oncotransformation can deliver a scientific basis for elaborating new effective methods of anticancer therapy. Further progress in this area is possible by studying human and mammalian living cell cultures at the single-cell level that is performed by computerized videomicroscopy of live cells which is a new promising approach in cancer research and development of anticancer drugs. In the study changes in a cell population of embryonic human fibroblasts during the process of immortalization are first described. It was shown that intensively proliferating spindle cells constitute an early stage of immortalization. Later on spindle cells differentiate into round ones in some areas of a cell monolayer. Detailed assessment of changes in the process of immortalization may be performed by means of the parallel (simultaneous) computer videorecording of many areas of cell culture.

Key words: cancer transformation, immortalization, computer videomicroscopy

УДК: 602.643.66.633.491

Стабильность наследования векторных конструкций с геном *cry3aM* в трансгенных растениях картофеля / Е.В. Исаенко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 130-135. Соавт.: Бердичевец И.Н., Манешина Т.В., Картель Н.А.

Стабильное наследование трансгена является необходимой предпосылкой для заключения об успехе применения трансгенных линий в последующем селекционном процессе. В статье представлены данные о наследовании трансгена *cry3aM* у потомства модифицированных растений картофеля. Показано, что у большинства исследованных линий наблюдается расщепление 3:1. ПЦР-анализ поддерживавшихся в культуре *in vitro* в течение 3 лет созданных трансгенных линий картофеля выявил неполную сохранность трансгенов *cry3aM* и *licB* по всем вариантам опыта. Ген *cry3aM* сохранился у 85,2%, а ген лихеназы *licB* у 66,6% проанализированных трансгенных линий картофеля.

Ключевые слова: картофель, ген бета-эндотоксина *cry3aM*, ген лихеназы, трансгенные линии

Stability of inheriting vector construction with gene *cry3aM* in transgenic potato plants / I. Isayenko [et. all] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 130-135. Berdichevets I., Maneshina T., Kartel N.

Stable transgene inheritance is a necessary precondition for the conclusion of the success in applying transgenic lines in a subsequent breeding process. The article presents the data on inheritance of the transgene *cry3aM* in progeny of modified potato plants. The 3:1 segregation ratio was shown to be observed in the majority of the lines under study. PCR analysis of the developed transgenic potato lines maintained in the *in vitro* culture for 3 years has revealed incomplete safe keeping of transgenes *cry3aM* and *licB* in all the experiment variants. The gene *cry3aM* remained in 85,2% and the lichenase gene *licB* did in 66,6% of the analysed transgenic potato lines.

Key words: potato, beta-endotoxin gene *cry3aM*, lichenase gene, transgenic lines

УДК 616-006.48:615.28

Эпигенетическое омоложение клеток и регенеративная медицина / О.В. Квитко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 12. Минск, 2011. С. 136-145. Соавт.: Конева И.И., Шейко Я.И., Сапун А.С., Балашенко Н.А., Дромашко С.Е.

Биологическое старение остается нерешенной проблемой, практическая важность которой демонстрируется исследованиями в области регенеративной медицины. Старение препятствует восстановительным процессам *in vivo*, а также продукции клеток *in vitro* с целью их прямого либо опосредованного (при создании искусственных органов) введения в организм. Для поиска средств замедления или ревертирования процессов старения представляет интерес ведущее к омоложению селективное эпигенетическое репрограммирование генома, при котором восстанавливаются длины теломерных повторов на концах хромосом, а также физиологически оптимальный для данного типа клеток спектр дифференциальной активности генов, определяемый метилированием ДНК и модификацией гистоновых белков хроматина, но не происходит дедифференцировка, возникающая при переносе ядер соматических клеток в цитоплазму яйцеклетки или при получении индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Согласно развитой теории омоложения в период эмбриогенеза и постнатального роста продуцируются биохимические и электромагнитные сигналы, репарирующие эпигенетические ошибки и тем самым омолаживающие клетки. Имеются данные, демонстрирующие возможность транзientной индукции омолаживающей импульсации, восстанавливающей паттерн геномной активности и теломерной ДНК в тканях взрослого организма и культурах клеток.

Ключевые слова: клеточное старение, метилирование ДНК, теломерные повторы, эпигенетическое омоложение, транзientная иммортализация

Epigenetic cell rejuvenation and regenerative medicine / O. Kvitko [et. all] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 12. Minsk, 2011. P. 136-145. Koneva I., Sheiko Ya., Sapun A., Balashenko N., Dromashko S.

Biological aging remains an unsolved problem. Its practical importance is illustrated by studies in the regenerative medicine. Aging hinders restorative processes *in vivo* and production of cells *in vitro* for their direct or indirect (in case of constructing artificial organs) introduction into organism. For searching the means of retardation or reversal of aging selective epigenetic genome reprogramming leading to rejuvenation is of special interest. Under this process restoration of telomeric repeats lengths at the ends of chromosomes and physiologically optimal (for a particular cell type) pattern of differential gene activity (determined by DNA methylation and modification of chromosomal histone proteins) takes place but dedifferentiation (that happens under somatic cell nuclear transfer into oocyte cytoplasm and during construction of induced pluripotent stem cells) does not occur. According to the developmental theory of rejuvenation during embryogenesis and postnatal growth special biochemical and electromagnetic signals are produced which repair epigenetic errors and, thereby, rejuvenate cells. Experimental data demonstrate the possibility of transient induction of rejuvenation signals that restores a pattern of genome activity and telomeric DNA in tissues of an adult organism and cells *in vitro*.

Key words: cellular aging, DNA methylation, telomeric repeats, epigenetic rejuvenation, transient immortalization

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ

Статьи должны быть написаны в сжатой и ясной форме и содержать:

- соответствующий индекс универсальной десятичной классификации литературы (УДК);
- название на русском и английском языках;
- инициалы и фамилии авторов на русском и английском языках;
- полное название учреждений, в которых выполнялось исследование и их почтовые адреса;
- ключевые слова (3...5 слов);
- аннотацию на русском и английском языках (100—150 слов). Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи;
- текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки «Введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение»);
- список использованных источников (оформляется в соответствии с Правилами ВАК, Приложение 2);
- дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10—12 страниц. Последняя страница статьи должна быть заполнена не менее чем на 4/5(!). После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентичного содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на дискете) и на бумажном носителе в 2 экз. В виде отдельного документа представляются краткие сведения о каждом из авторов, включающие фамилию, имя, отчество, год рождения, сведения об образовании, служебные адреса, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность, область научных интересов. Необходимо представить АКТ ЭКСПЕРТИЗЫ о возможности опубликования открытой печати (для статей).

1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS-Word. Название файлов — фамилия первого автора латинскими буквами.

2. Формат бумаги А4 (297х210 мм), ориентация — книжная.

3. Поля: верхнее — 2,5 см, нижнее — 2,5 см, левое — 2,5 см, правое — 2,5 см.

4. Основной текст статьи набирается шрифтом Times New Roman, размером 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.

5. Автоматическая расстановка переносов обязательна.

6. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.

7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS-Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).

8. Вставка в текст символов (например, β , 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 12

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*
Переводчик *Г.А. Мартысь*
Верстка *Е.П. Нестерович*
Технический редактор *В.Г. Гавриленко*

Подписано в печать 29.03.2011. 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».