

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 14**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2013

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: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», 2013. – Т. 14. – 146 с. – ISSN 1999-9127.

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

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

Редакционная коллегия:

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

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Л.В. Хотылева, Р.И. Гончарова</i> Академик Н.В. Турбин – основатель современной белорусской генетической школы.....	7
<i>В.П. Ямскова, М.С. Краснов, Е.Ю. Рыбакова, В.В. Богданов, А.П. Ильина, О.Г. Куликова, Д.И. Мальцев, И.А. Ямсков</i> Новая группа мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов: идентификация, физико-химические свойства и биологическое действие	14
<i>Е.Э. Хейдорова, Г.Г. Хрисанфова, Е.И. Бычкова, С.К. Семенова М.Е. Никифоров</i> Полиморфизм митохондриального гена <i>cox1</i> в популяции марит трематод <i>Bilharziella polonica</i> (сем. <i>Schistosomatidae</i>), паразитирующих у водоплавающих птиц на озере Нарочь.....	24
<i>Е.А. Волуевич</i> Генетические подходы в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине.....	36
<i>Е.А. Волуевич</i> Генетические подходы в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к мучнистой росе	46
<i>В.А. Кунах, Л.П. Можилевская</i> Длительность жизни человека и биотехнология растений.....	56
<i>А.И. Шапошников, Т.С. Азарова, Л.В. Кравченко, А.А. Бажанова, Д.П. Бажанов, О.Г. Бабак, Н.А. Некрашевич, А.В. Кильчевский</i> Корневые выделения генотипов томата (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), отличающихся отзывчивостью на бактеризацию	63
<i>М.Е. Михайлова, Е.Л. Романишко</i> Полиморфизм генов соматропиновой оси (<i>pGH, pIGF-2, pIGF-1, pIGF-1R</i>) у свиньи домашней (<i>Sus Scrofa domesticus</i>).....	69
<i>О.А. Орловская, Л.В. Хотылева</i> Оценка устойчивости к биотическим и абиотическим факторам гибридов озимой тритикале, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения.....	77
<i>С.Е. Дромашко</i> Развитие математической генетики и биоинформатики в Беларуси	84
<i>Д.П. Бажанов, К.К. Яцевич</i> Конъюгационный перенос генов деградации симазина <i>Herbaspirillum huttiense</i> B601 в родственные бактерии	95

<i>Л.А. Кундас, К.В. Жур, Н.И. Бышнев, Т.Н. Прохорова, Е.А. Лосицкий, П.Н. Малашевич, И.Б. Моссэ</i> Анализ молекулярно-генетических маркеров, ответственных за устойчивость к физическим нагрузкам, у представителей академической гребли	101
<i>Н.В. Савина, Т.Д. Кужир, А.И. Ролевич, С.Л. Поляков, С.А. Красный, Р.И. Гончарова</i> Особенности дестабилизации генома лимфоцитов периферической крови при раке мочевого пузыря	106
<i>О.В. Квитко, А.С. Сапун, Н.А. Балащенко, Я.И. Шейко, И.И. Конева, С.Е. Дромашко</i> Теломерная концепция старения и онкогенеза для медицины.....	113
<i>М.И. Федорова, С.А. Ветрова, Е.Г. Козарь</i> Особенности размножения инбредных потомств свеклы столовой при селекции на гетерозис	121
<i>А.Ф. Стельмах</i> Идеи Н.В. Турбина для развития генетических работ Селекционно-генетического института.....	130
Рефераты.....	135
Правила оформления статьи.....	144

CONTENTS

<i>L. Khotyleva, R. Goncharova</i> Academician N.V. Turbin – the founder of the modern Belarusian genetic school	7
<i>V. Yamskova, M. Krasnov, E. Rybakova, V. Bogdanov, A. Il'ina, O. Koulikova, D. Maltsev, I. Yamskov</i> A new group of membrane-acting tissue-specific homeostatic bioregulators: identification, physicochemical properties and biological action.....	14
<i>E. Kheidorova, G. Chrisanfova, E. Bychkova, S. Semenova, M. Nikiforov</i> Polymorphism of mitochondrial gene <i>cox1</i> in the population of maritas <i>Bilharziella polonica</i> (family <i>Schistosomatidae</i>) parasitizing in wildfowl of Lake Naroch'.....	24
<i>E. Voluevich</i> Genetic approaches in common wheat breeding for resistance to brown rust	36
<i>E. Voluevich</i> Genetic approaches in common wheat breeding for resistance to powdery mildew.....	46
<i>V. Kunakh, L. Mozhylevskaya</i> Human lifespan and plant biotechnology	56
<i>A. Shaposhnikov, T. Azarova, L. Kravchenko, A. Bazhanova, D. Bazhanov, O. Babak, N. Nekrashevich, A. Kilchevsky</i> Root exudates of tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) genotypes differing in responsiveness to bacterization.....	63
<i>M. Mikhailova, H. Ramanishka</i> Polymorphism genes somatotropic axic (<i>pGH, pIGF-2, pIGF-1, pIGF-1R</i>) in the pig domestic (<i>Sus Scrofa domestica</i>).....	69
<i>O. Orlovskaya, L. Khotyleva</i> Evaluation of resistance to biotic and abiotic factors of winter triticale hybrids, obtained by crossing between forms of different ecological-geographic origin	77
<i>S. Dromashko</i> Development of mathematical genetics and bioinformatics in Belarus	84
<i>D. Bazhanov, K. Yatsevich</i> Conjugational transfer of the <i>Herbaspirillum huttiense</i> B601 genes for simazine degradation to related bacteria.....	95

<i>L. Kundas, K. Zhur, N. Byshnev, T. Prohorova, Y. Lasitski, P. Malashevich, I. Mosse</i> Analysis of genetic markers for resistance to a physical stress in elite collegiate rowers	101
<i>N. Savina, T. Kuzhir, A. Rolevich, S. Polyakov, S. Krasnyi, R. Goncharova</i> The features of genome destabilization in peripheral blood lymphocytes in bladder cancer.....	106
<i>O. Kvitko, A. Sapun, N. Balashenko, I. Koneva, Y. Sheiko, S. Dromashko</i> Telomere concept of aging and oncogenesis for medicine.....	113
<i>M. Fedorova, S. Vetrova, E. Kozar</i> Features of reproduction of inbred progeny of red beet for heterosis breeding	121
<i>A. Stelmakh</i> N.V. Turbin's ideas for the evolution of genetic investigations in Plant Breeding and Genetics Institute	130
Summaries	135
Instructions to authors	144

АКАДЕМИК Н.В. ТУРБИН – ОСНОВАТЕЛЬ СОВРЕМЕННОЙ БЕЛОРУССКОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ШКОЛЫ (обзорная статья)

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

3 декабря 2012 года исполнилось 100 лет со дня рождения Николая Васильевича Турбина – академика Национальной академии наук Беларуси и Российской сельскохозяйственной академии, выдающегося ученого генетика, основателя школы белорусских генетиков, создателя Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси и его первого директора.

Родился Н.В. Турбин в 1912 г. в рабочем поселке Тума Рязанской области. В 1929 г. окончил Тумскую школу 9-летку и в 1930 г. поступил на агрономический факультет Воронежского сельскохозяйственного института. Уже в студенческие годы проявился его большой интерес к научной работе, и после окончания института Николая Васильевича оставляют в аспирантуре при кафедре генетики и селекции. В 1938 г. он успешно защищает кандидатскую диссертацию, посвященную разработке методики селекции сортов яровой пшеницы, и зачисляется на должность доцента кафедры генетики и селекции этого же института. Будучи аспирантом, Николай Васильевич проходит годичную стажировку в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, где слушает лекции выдающихся ученых биологов того времени – И.И. Шмальгаузена, А.Н. Серебровского, М.М. Завадовского, Н.К. Кольцова и др.

В 1939 г. Н.В. Турбин поступает в докторантуру Академии наук СССР, которую проходит в лаборатории эволюционной экологии растений под руководством академика Б.А. Келлера, крупного ученого в области геоботаники и экологии растений. В 1942 г. в г. Ашхабаде, будучи курсантом военно-медицинского училища, в возрасте 30 лет Николай Васильевич успешно защищает докторскую диссертацию (это были годы Великой отечественной войны

1941–1945 гг.). После защиты Николай Васильевич в течение двух лет заведует отделом Московского ботанического сада Академии наук СССР и одновременно работает профессором в Московском областном педагогическом институте.

В 1945 г. Н.В. Турбин возглавил кафедру генетики Ленинградского государственного университета, а с 1948 по 1951 год – он декан биолого-почвенного факультета и директор Биологического научно-исследовательского института ЛГУ.

Этот период в научной деятельности Николая Васильевича был очень плодотворным. Под его руководством сотрудники кафедры и многочисленные ученики за короткое время накопили богатый экспериментальный материал, анализ которого позволил прояснить биологические особенности протекания процесса оплодотворения.

Результаты работ Н.В. Турбина по биологии оплодотворения получили широкую известность среди ученых биологов. Они были доложены и опубликованы в трудах международных конгрессов (ботанического и генетического) в г. Стокгольме (Швеция, 1953 г.) и г. Монреале (Канада, 1958 г.), вошли в учебники и сводки по вопросам общей биологии, генетики и селекции, изданные в СССР и за рубежом.

В 50–60-е годы XX столетия в Академии наук БССР начинается многостороннее развитие современных научных направлений естественных наук, для чего в г. Минск на работу приглашаются известные ученые из ведущих научных центров и университетов СССР. В числе приглашенных для руководства Институтом биологии Академии наук БССР был и Николай Васильевич Турбин, который в 1953 г. избирается академиком Академии наук БССР.

В исторических сводках о путях формирования генетики в нашей республике упоминаются работы по теории селекции, выполнявшиеся на рубеже XX столетия в Горы-Горецком земледельческом училище выдающимся агробиологом М.В. Рытовым. Позже, уже в Белорусской сельскохозяйственной академии проводятся исследования по генетике и селекции растений и животных профессорами К.Г. Ренардом, Н.В. Найденовым, Б.А. Вакаром, А.Н. Ипатьевым. Выдающиеся теоретические разработки по генетике пшеницы, получившие мировую известность, были выполнены в сороковые годы XX столетия академиком Академии наук Беларуси А.Р. Жебраком.

Приезд Николая Васильевича Турбина в Беларусь определил дальнейший путь развития генетических исследований в республике. В рамках Института биологии в 1955 г. создается Отдел генетики. К работе привлекаются ученики Николая Васильевича – ленинградцы А.Н. и А.И. Палиловы, Е.И. Заливская, И.М. Суриков, Ю.Б. Вахтин. В аспирантуру, которую открывают по специальности «генетика», зачисляются первые аспиранты Николая Васильевича – В.Е. Бормотов, В.Г. Володин, Н.В. Атрашенко и В.Н. Загрекова, которые продолжают начатые еще в Ленинградском университете исследования по вопросам биологии оплодотворения сельскохозяйственных растений.

В этот период в СССР началось повсеместное увлечение культурой кукурузы как эффективного способа укрепления кормовой базы животноводства. Академии наук БССР также поручили заняться решением этой проблемы. Небольшой, но очень увлеченный и дружный коллектив Отдела генетики с энтузиазмом включился в разработку генетических проблем. Жаркие споры, обсуждение каждой новой работы, поиски оригинальных путей решения поставленных задач, активное изучение английского языка (без этого уже было немислимо движение вперед) – такой была атмосфера в отделе в те годы. Все с нетерпением ждали появления Николая Васильевича, ибо он обладал той завидной способностью щедро делиться богатством своих знаний, которая присуща одаренным людям, безгранично преданным своему делу.

Необходимость заниматься выращиванием кукурузы на многие годы определила основное научное направление Отдела генетики Инсти-

тута биологии АН БССР. Николай Васильевич направил наши усилия на решение в научном плане биологической проблемы гетерозиса (гибридной мощности). Кукуруза была именно тем генетическим объектом, на котором решались многие теоретические вопросы, связанные с этим явлением, и именно на кукурузе была показана перспектива использования гетерозиса для повышения продуктивности растений. Одновременно начались работы по изучению гетерозиса у томата, сахарной свеклы, зерновых культур.

За очень короткий срок, благодаря инициативе Николая Васильевича, Отдел генетики, в рамках которого были выполнены разносторонние генетические исследования, решением Президиума Академии наук СССР преобразовывается в 1965 г. в Институт генетики и цитологии Академии наук БССР и становится центром научных исследований по проблемам генетики в республике. Результаты, полученные к этому времени коллективом и доложенные Николаем Васильевичем и сотрудниками на различных форумах в СССР и за рубежом, выдвигают Институт на передовые позиции.

Первые теоретические результаты исследований Н.В. Турбина, и руководимого им коллектива были обобщены в книге «Гетерозис», вышедшей в 1961 г. в Издательстве академии наук Белорусской ССР и сразу же ставшей библиографической редкостью. Кроме сотрудников Института среди авторов монографии были известные иностранные ученые – А. Мюнтцинг (Швеция), Х. Даскалов (Болгария), А. Балинт и Г. Ковач (Венгрия), Л. Ржиман (Чехословакия).

В результате обобщения и критического анализа итогов собственных исследований и данных литературы Николай Васильевич предложил новую концепцию для объяснения причин гетерозиса, основанную на теории генетического баланса. Главная ценность этой концепции состоит в правильном подходе к выяснению причинно-следственных связей между наследственными факторами и контролируемыми признаками. Она выражает собой общий подход к объяснению причин гетерозиса и исходит из представления о разнонаправленном действии на развитие признака многих наследственных факторов. Согласно этой концепции, при скрещивании линий, специально подобранных по комбина-

ционной способности, образуются гибриды, у которых число генов, вызывающих плюс-эффекты, существенно возрастает, а число генов с минус-эффектами уменьшается по сравнению с обеими родительскими формами. Изменение баланса в действии генов, стимулирующих развитие данного признака, проявляется в возрастании его количественного выражения, т.е. в виде гетерозисного эффекта.

В ходе дальнейших исследований были сделаны теоретические обобщения данных по генетике гетерозиса, принципам и методам селекции на комбинационную способность, генетике цитоплазматической мужской стерильности, методам получения полиплоидных форм сахарной свеклы и гетерозисных гибридов на их основе, методам периодического отбора на комбинационную способность, математическим проблемам гетерозиса.

Одним из важных этапов работы в селекции на гетерозис является оценка комбинационной способности родительских форм гибридов, так как от ее уровня зависит величина гетерозиса. Под руководством Н.В. Турбина впервые в Советском Союзе разрабатываются экспериментальные методы оценки комбинационной способности на основе диаллельного анализа, которые после опубликования монографии «Диаллельный анализ в селекции растений» (Турбин, Хотылева, Тарутина, 1974) получили широкое распространение в различных селекционно-генетических центрах Советского Союза.

В плане развития исследований по гетерозису, по инициативе Н.В. Турбина, сотрудниками Отдела генетики разрабатывается модификация метода периодического отбора линий для получения высокопродуктивного межлинейного гибрида на основе оценки их комбинационной способности при межсортовых скрещиваниях. Результаты этой работы доложены на XIII Международном генетическом конгрессе (г. Беркли, США, 1973) и опубликованы в монографии «Периодический отбор в селекции растений» (Турбин, Хотылева, Каминская, 1976). Разработан алгоритм статистических расчетов и выведены рабочие формулы, позволяющие оценивать комбинационную способность генетически разнокачественных наборов родительских форм (Савченко, 1984, 1986). Исследованы генетические основы и принципы селекции

на комбинационную способность компонентов гибридизации, выявлены типы действия генов при гетерозисе и роль среды в его проявлении у различных культур, показана возможность многократного использования эффекта гетерозиса (Палилов, 1976; Хотылева, Тарутина, 1982; Каминская, 1985; Тарутина, Хотылева, 1990). Для исследования механизмов гетерозисного эффекта привлекаются методы биохимии и молекулярной генетики. Результаты изучения биоэнергетических процессов при гетерозисе позволили реализовать системный физиолого-биохимический подход к оценке селекционного материала и установить причинно-следственные связи между биоэнергетическими показателями и продуктивностью (Хотылева, Разумович, Титок, Юренкова, Русинова, Лемеш, 1991).

Под руководством Н.В. Турбина теоретически обоснованы и методически разработаны новые программы селекции озимой ржи на основе гетероплоидных скрещиваний, предложен метод переноса доминантных генов с диплоидного на тетраплоидный уровень, получена низкостебельная тетраплоидная форма, созданы уникальные коллекции инбредных самофертильных линий и трисомная серия линий озимой ржи (Кедров-Зихман, Шилко, 1979). При разработке теории и методов формирования генетически сбалансированных гетерозисных популяций растений (синтетических сортов) предложена оригинальная математическая модель, позволяющая определять зависимость относительной продуктивности формируемых популяций от показателя общей комбинационной способности, степени инбридинга и числа объединяемых компонентов для полигенно контролируемого признака (Кедров-Зихман, 1974).

Проблеме гетерозиса Н.В. Турбин придает всесоюзное звучание. Он организывает проблемный совет по гетерозису и формирует всесоюзную программу, для участия в разработке которой приглашает ведущих генетиков и селекционеров страны. На объединенной сессии ВАСХНИЛ и Отделения общей биологии АН СССР, состоявшейся в Москве в 1966 году, Институт генетики и цитологии был признан ведущим научным центром генетических исследований по проблеме гетерозиса в СССР.

Для практического использования явления гетерозиса необходимо было выяснить возможность создания гибридов на цитоплазматически стерильных материнских растениях, что значительно удешевило бы и упростило процесс получения гибридных семян. Н.В. Турбин совместно с профессором А.Н. Палиловой организует пионерские исследования процесса взаимодействия ядерной и цитоплазматической генетических систем. На основании комплексного изучения микроспорогенеза у стерильных форм и их фертильных аналогов была разработана теоретическая модель взаимодействия ядерных генов и плазмогенов при формировании цитоплазматической мужской стерильности. Данные исследования получили широкий отклик за рубежом и стали началом выяснения аналогичного механизма у разных сельскохозяйственных растений. Результаты исследований по этой важной генетической проблеме изложены в монографии Н.В. Турбина и А.Н. Палиловой «Генетические основы цитоплазматической мужской стерильности у растений» (Мн., 1975). Дальнейшее развитие этих исследований учениками Н.В. Турбина привело к получению новой информации по проблемам взаимодействия ядерных и цитоплазматических генетических систем у растений, что высоко оценено научной общественностью, а авторы работы А.Н. Палилова, Е.А. Волуевич, П.А. Орлов удостоены Государственной премии Республики Беларусь 2002 г.

Совместно со своим учеником, ныне членом-корреспондентом НАН Беларуси В.Е. Бормотовым, Н.В. Турбин начинает исследования в области экспериментальной полиплоидии и гетерозиса. Создается первая в СССР коллекция тетраплоидных форм сахарной свеклы. На основе лучших тетраплоидных линий начато получение триплоидных гибридов, которые высеваются не только на полях Беларуси, но и в других республиках СССР. В процессе работы изучены особенности роста и развития тетраплоидных и триплоидных растений свеклы, дана характеристика их морфологических, анатомических и физиологических признаков, изучена цитогенетика полиплоидных форм. Н.В. Турбин высказывает мысль, что повышение продуктивности полиплоидных гибридов является не только результатом полиплоидии,

но достигается в большей степени за счет гетерозисного эффекта, возникающего при правильном подборе родительских компонентов. Результаты этих исследований опубликованы в книге В.Е. Бормотова и Н.В. Турбина «Экспериментальная полиплоидия и гетерозис у сахарной свеклы» (1972). Работы в этом направлении увенчались созданием и районированием ряда высокоурожайных и высокосахаристых триплоидных гибридов.

Теоретические и методические разработки по проблеме гетерозиса нашли широкое практическое использование при выведении гетерозисных гибридов в Беларуси и других странах СНГ. По вопросам генетики гетерозиса Н.В. Турбин неоднократно выступал с докладами и лекциями за рубежом – в Лондоне. За цикл работ «Генетика гетерозиса и пути его использования в селекции растений» сотрудникам Института – Н.В. Турбину, Л.В. Хотылевой, В.Е. Бормотову, О.О. Кедрову-Зихману, В.К. Савченко, Е.А. Бычко, Л.Н. Каминской, Л.А. Тарутиной, Б.Ф. Магросову, А.И. Палилову – в 1984 г. присуждена Государственная премия республики Беларусь.

Н.В. Турбин развивает разносторонние генетические исследования мутационного процесса на растениях, микроорганизмах и животных. Длительное время в Институте проводилось изучение закономерностей мутационной изменчивости зерновых культур под воздействием радиации и лазерного облучения. Выявлено и изучено явление генетической нестабильности радиационных мутантов (Володин, 1975; Володин и др., 1982). В этот же период выходит в свет монография «Гетерозис и радиоустойчивость растений» (Турбин, Володин, Гордей, 1977).

В связи с пуском в БССР атомного реактора Николай Васильевич инициирует изучение генетической эффективности нейтронов промежуточных энергий. Совместно с профессором Н.А. Троицким на микроорганизмах, растениях, дрозофиле и мышах исследована относительная биологическая эффективность нейтронного облучения и после проведенных экспериментов были внесены соответствующие коррективы в нормативы радиационной защиты. Материалы этих исследований опубликованы Н.А. Троицким, Н.В. Турбиным и М.А. Арсеньевой в монографии «Генетические эффекты промежуточных нейтронов» (Минск, 1971).

По инициативе Н.В. Турбина Р.И. Гончаровой была начата работа по выявлению антимуtagens, по разработке структурно-функционального подхода для поиска антимуtagens, по выяснению закономерностей и механизмов защитного действия антимуtagens в половых и соматических клетках различных организмов, результаты которой были опубликованы в монографии «Антимутагенез» (Минск, 1974). Развитие этого направления привело к созданию концепции антимутагенеза как генетически обусловленного процесса, который осуществляется многокомпонентной антимутагенной системой на клеточном и организменном уровнях, способствуя поддержанию стабильности генома и нормальному функционированию организма (Гончарова, 1984, 1993). В дальнейших исследованиях лаборатории антимутагенеза (с 2006 г. лаборатория генетической безопасности) разрабатывается концепция действия антимуtagens как триггеров эндогенных защитных механизмов (репарации ДНК, биотрансформации ксенобиотиков, поли-АДФ-рибозилирования и др.), вовлеченных в координированную регуляцию генных сетей организма. Установлено, что антимутагены являются стимуляторами жизнеспособности и продуктивности. Тем самым создана основа для использования антимуtagens в здравоохранении и сельском хозяйстве, в частности для повышения продуктивности аквакультуры. Так, разработаны технологии по повышению продуктивности некоторых видов рыб путем использования антимутагена «Дилудин» в виде кормовой биодобавки.

При поддержке Николая Васильевича группой сотрудников во главе с Г.В. Красковским проведены исследования по онкогенетике, в процессе которых сформулирована генетическая концепция раковой анергии и предложен оригинальный подход к диагностике рака.

В 70-е годы в Институте получают развитие исследования по генетической трансформации растений, молекулярной генетике и биотехнологии. По инициативе Н.В. Турбина, сначала совместно с Институтом прикладной молекулярной биологии и генетики ВАСХНИЛ, а затем самостоятельно были развернуты исследования по генетической трансформации растений – совершенно новому в то время направлению мировой науки (Турбин и др.,

1975). Для решения этих проблем в нашем институте была создана лаборатория молекулярной генетики под руководством академика Н.А. Картеля, одним из основных направлений которой являются исследования структурно-функциональной организации геномов и молекулярное картирование генов у сельскохозяйственных растений.

Сотрудниками лаборатории разработана технология создания трансгенных растений, толерантных к широкому спектру тяжелых металлов и нефтепродуктов, и на ее основе получены трансгенные растения табака, способные успешно расти на почвах, загрязненных нефтепродуктами, а также содержащих высокие концентрации меди, свинца, цезия, алюминия и других металлов. Технология может быть использована для селекции трансгенных сельскохозяйственных и древесных растений, пригодных для выращивания на загрязненных тяжелыми металлами и нефтепродуктами территориях. Также развернуты исследования по получению трансгенных растений рапса и картофеля, устойчивых к гербицидам и грибным болезням (Картель, 1981, Урбанович, Картель, 1998, Картель и др., 1999, 2000, 2002).

Сегодня, спустя много лет, со всей остротой просматриваются незаурядные способности и талант Николая Васильевича Турбина как руководителя научного коллектива. Он обладал необыкновенным даром зажечь интерес сотрудника к проблеме, предлагаемой к разработке. Без преувеличения можно сказать, что многие направления научных исследований, выполняемых в институте до последнего времени – это продукты его идей. Удивительная научная интуиция, способность инициировать идеи, широкий диапазон мыслей и интересов, умение поделиться этим богатством с учениками и коллегами были очень ценным даром руководителя. Сегодня мы развиваем свои научные школы – по проблемам гетерозиса, хромосомной наследственности, молекулярной генетики, антимутагенеза, но в исходной точке лежат те исследования, которые начинались еще при Николае Васильевиче Турбине.

Огромная эрудиция и большой научный опыт позволили Н.В. Турбину, наряду с теоретическими и экспериментальными трудами в области генетики и селекции растений, опубликовать ряд широко известных работ

по вопросам видообразования, философским проблемам генетики, прогнозирования направлений и методов селекции растений. Так, одна за другой выходят его статьи: «Дарвинизм и новое учение о виде» (Ботанический журнал, 1952, т. 37, № 6), «О некоторых спорных вопросах теории видообразования» (Вестник ЛГУ, 1953, № 7), «Когда нечего сказать по существу» (Журнал общей биологии, 1953, т. 15, № 3), «О современной концепции гена» (Вестник АН СССР, 1957, № 4), «О философских вопросах современной генетики» (Вопросы философии, 1958, № 2). Следует напомнить, что это было очень непростое время в отечественной биологии, поэтому каждая из названных публикаций представляет собой отражение общей ситуации в биологии. Так, в вышедшей в 1952 г. на страницах «Ботанического журнала» статье «О спорных вопросах теории видообразования», впервые, после печально знаменитой августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 г., прозвучала критика взглядов Т.Д. Лысенко, открывшая дискуссию по вопросам видообразования. Не менее острой была статья «О философских вопросах современной генетики» (1958 г.), в которой Николай Васильевич по приглашению редколлегии журнала «Вопросы философии» и руководства Института философии Академии наук СССР выступил в защиту молекулярной биологии. Это новое по тем временам направление, получившее признание в мировой науке и успешно развивавшееся в научных центрах Запада, в нашей стране (бывшем Советском Союзе) было объявлено «псевдонаучным извращением, порожденным буржуазной идеологией».

С течением времени руководимый Николаем Васильевичем коллектив успешно завоевывал признание своих коллег в стране и за ее пределами. Публикация трудов Института, выступления Н.В. Турбина на генетических конгрессах и различного рода генетических форумах, активная позиция в вопросах использования достижений генетики для сельскохозяйственного производства способствовали высокой оценке руководством страны незаурядных организаторских способностей Николая Васильевича. В 1967 г. он избирается академиком Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук, а в 1968 г. – академиком-секретарем Отделения растениеводства и селекции – крупнейшего

подразделения ВАСХНИЛ. В 1971 г. Николай Васильевич оставляет Институт генетики и цитологии в Минске и переезжает на работу в Москву. Его талант ученого, организатора и активная научная деятельность явились предпосылкой значительного повышения теоретического уровня исследований, выполняемых в Институтах ВАСХНИЛ, в более эффективной организации прикладных исследований по растениеводству в СССР. В 1974 г. он создает в Москве Всесоюзный институт прикладной молекулярной биологии и генетики ВАСХНИЛ, которым руководит до 1980 г.

В последние годы своей жизни Николай Васильевич возглавлял лабораторию генетики и физиологии продуктивности Всесоюзного (ныне Всероссийского) института растениеводства им. Н.И. Вавилова. Последним его научным увлечением стали исследования по генетике и селекции тритикале, которые он начинал в Беларуси, когда этой культуры еще в республике не знали. Все, к чему он прикасался, приобретало особое значение и масштабность. Работа по тритикале развевалась в разных районах СССР. Исследования проводились в России, Беларуси, Украине, Узбекистане, Киргизии и Таджикистане. Были созданы, испытаны и районированы в разных зонах Союза высокоурожайные сорта этой культуры, изучены особенности нового морфофизиологического типа гексаплоидного тритикале, отличающегося резко повышенной продуктивностью колоса, наиболее отзывчивого на интенсивную технологию выращивания, с потенциальной урожайностью при озимом посеве до 110–120 ц/га. Выведенный под руководством Н.В. Турбина и при его непосредственном участии в процессе селекции сорт ярового тритикале «Немига 2» был зарегистрирован Государственным агропромышленным комитетом СССР в 1982 г. и районирован в Киргизии и Таджикистане.

После отъезда в Москву Николай Васильевич не прерывал связи с созданным им Институтом генетики и цитологии Академии наук Беларуси. Он был частым его гостем. В период отпуска, который Н.В. Турбин, как правило, проводил у себя на даче под Минском, мы организовывали деловые встречи в институте – обсуждали свои проблемы с Николаем Васильевичем, который оставался на-

шим учителем и большим другом. Несмотря на переезд в Москву, он сохранил членство в Белорусском обществе генетиков и селекционеров, участвовал в его работе, и был постоянным делегатом наших съездов. В 1997 году Н.В. Турбин принял участие в работе VII-го съезда Общества генетиков и селекционеров Беларуси, который проходил в г. Горки Могилевской области в Белорусской сельскохозяйственной академии. Это был его последний визит в Беларусь. Летом 1998 г. Николай Васильевич ушел из жизни.

Как ученый, Н.В. Турбин всегда был преисполнен новыми идеями, рабочими гипотезами, он был неиссякаемым источником научных знаний. Людей, близко знавших его, поражала разносторонность его интересов. Николая Васильевича занимали вопросы самых разнообразных областей естествознания, он любил и хорошо знал философию, историю, русскую и зарубежную литературу, поэзию, искусство. С ним было очень интересно работать и об-

щаться. Он привлекал своей безграничной любовью к науке. И нам, его ученикам и последователям, очень дороги слова, прозвучавшие в одной из последних публикаций («Неман», 1993, № 4), где он пишет: «Большое удовлетворение испытываю я также от создания и успешной деятельности Института генетики и цитологии НАН Беларуси, директором и организатором которого я был, и в котором, после переезда в Москву, оставил свое сердце. Горжусь тем, что Институт, в составе которого работают многие мои ученики, стал важным центром генетических исследований...»

Нынешний X съезд Белорусского общества генетиков и селекционеров проходил 9–11 октября 2012 г. в г. Минске в год 100-летия со дня рождения академика Н.В. Турбина. Доброй памятью нашей о Николае Васильевиче будет дальнейшее успешное развитие тех научных начинаний, идей и замыслов, в которые он вложил свою душу и вдохновителем которых был на протяжении всей своей жизни.

Дата поступления статьи 17 декабря 2012 г.

В.П. Ямскова¹, М.С. Краснов², Е.Ю. Рыбакова¹, В.В. Богданов², А.П. Ильина², О.Г. Куликова²,
Д.И. Мальцев², И.А. Ямсков²

НОВАЯ ГРУППА МЕМБРАНОТРОПНЫХ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

¹ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

²ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН

Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28

Введение

В настоящее время известно большое количество биологически активных молекул, влияющих на различные процессы метаболизма в организме (цитокины, гормоны, различные медиаторы). Но, поиск новых молекул является актуальным, особенно в аспекте исследования регуляторных веществ в межклеточном пространстве тканей, которые ответственны

за фактор регуляции клеток опосредованно через клеточную адгезию. Предметом данной работы являлось исследование новых биологически активных веществ, которые изначально были выделены как молекулы адгезии, а далее было показано их влияние на основные биологические процессы в живых системах.

Материалы и методы

Биорегуляторы были выделены из различных тканей по разработанной методике при пониженной температуре в физиологическом растворе.

Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ) обычно сосредоточены в надосадочной жидкости (супернатанте) при высаливании тканевых экстрактов в насыщенном растворе сернокислого аммония. Далее данная фракция супернатанта могла быть разделена с помощью методов изоэлектрофокусирования либо обращенно-фазовой ВЭЖХ. Детекцию фракций белков проводили спектрофотометрически при 280 нм. Для обращенно-фазовой ВЭЖХ применяли хроматограф Agilent 1100 Series (США), колонку Биохиммак С8-200 (4,6 мм × 150 мм), градиент вода (0,1% ТФА)–ацетонитрил, скорость элюции 0,5 мл/мин. Размер белковых частиц в растворах определяли методом лазерного динамического светорассеивания [1] либо с помощью метода атомно-силовой микроскопии [2]. Для биотестирования фракций биорегуляторов использовали ранее разработанный адгезиометрический метод [3], на органотипической культуре печени мышей оценивали параметр, отражающий мембранотропную активность. Определение вторичной структуры проводили с помощью метода

кругового дихроизма. Спектры кругового дихроизма в УФ-области (195–260 нм) снимали на КД-спектрометре Jasco 720 (Япония) при 20 °С в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 мм. Скорость сканирования – 50 нм/мин, шаг – 1 нм, накопление каждого шага – 2 сек. Концентрация исследуемого белка в водном растворе составляла 60–400 мкг/мл. Итоговый спектр получали по результатам усреднения данных трех сканирований и вычитания спектра базовой линии (контроля). Содержание элементов вторичной структуры оценивали с помощью программы CDNN (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn>). Анализ молекулярной массы белков проводили методом MALDI-TOF на время-пролетном масс-спектрометре UltraFlex 2 (Bruker Daltonic, Германия). Время-пролетные масс-спектры фиксировали в линейном режиме и режиме рефлектора. Для проведения масс-спектрометрического анализа образцы упаривали досуха, остаток растворяли в 70%-ном ацетонитриле, содержащем 0,1% ТФУ, до образования раствора с концентрацией не менее 10 пмоль/мкл. В работе использовали следующие матрицы: синапиновая кислота, 2-циано-4-гидроксикоричная кислота. Для исследования специфической биологической активности био-

регуляторов был разработан ряд новых моделей органотипического культивирования тканей и органов позвоночных животных [4–8]. Особенно яркое действие биорегуляторов наблюдали при роллерном органотипическом культивировании

тканей. Локализацию в тканях биорегуляторов проводили с помощью получения поликлональной антисыворотки к соответствующим биорегуляторам и последующей иммуногистохимической реакции на срезах тканей.

Результаты и обсуждение

Биорегуляторы данной группы, которая получила название «мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы», были обнаружены нами в различных тканях животных позвоночных и беспозвоночных, растений, грибов [9].

МГТБ проявляют ряд достаточно оригинальных свойств, их изучение способствовало разработке определенного экспериментального подхода к изучению биорегуляторов данной группы [3]. Его основу составляют экстракция МГТБ из тканей, их очистка, изучение состава и биологического действия. Например, для изучения биологической активности МГТБ был разработан метод их биотестирования, основанный на оценке мембранотропного действия биорегуляторов. Для исследования влияния биорегуляторов на состояние клеток и тканей были разработаны экспериментальные модели роллерного органотипического культивирования, в основном, тканей амфибий, поскольку они лучше тканей мле-

копитающих выдерживают условия длительного культивирования, а активность МГТБ характеризуется отсутствием видовой специфичности.

На данных моделях было продемонстрировано влияние МГТБ в сверхмалых дозах, соответствующих 10^{-8} – 10^{-15} мг белка/мл (СМД), на ход и направленность таких важнейших биологических процессов как адгезия и миграция клеток, клеточная пролиферация и дифференцировка, апоптоз. Было показано, что биорегуляторы данной группы стимулируют восстановление и репарацию в поврежденных тканях за счет дополнительной активации клеточных источников регенерации в ткани [9].

Иммуногистохимическими методами была показана их внеклеточная локализация (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют в пользу высказанного нами предположения об участии данных биорегуляторов в образовании структуры «малого» матрикса.

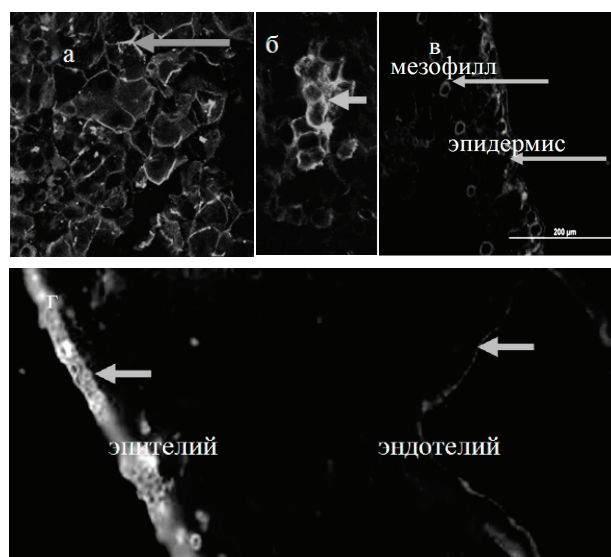


Рис. 1. Локализация биорегуляторов в тканях. Локализация биорегулятора, выделенного из сыворотки крови на поверхности клеток печени тритона: а) гепатоцитов; б) клеток кровотока (указано стрелками) (Ув. ок. $\times 10$, об. $\times 100$); в) локализация биорегулятора, выделенного из лукович чеснока, в ткани отростка чеснока на поверхности клеток эпидермиса и округлых клеток губчатого мезофилла (указано стрелками) (Ув. ок. $\times 10$, об. $\times 20$); г) локализация биорегулятора, выделенного из рогицы – на поверхности клеток эпителия и эндотелия рогицы (указано стрелками): а) тритона (Ув. ок. $\times 10$, об. $\times 20$); б) крысы (Ув. ок. $\times 10$, об. $\times 10$).

Результаты исследований показали, что МГТБ имеют сложный состав: они представляют собой комплексы биологически активных пептидов (регуляторные пептиды, РП), в том числе углеводсодержащих, и белков, которые модулируют активность РП. Ионы кальция играют большую роль в организации МГТБ – они участвуют во взаимодействии отдельных компонентов МГТБ между собой (рис. 2). Экспериментально показано, взаимодействие РП с белками-модуляторами происходит по принципу углевод-белкового взаимодействия: белок-модулятор, подобно

лектину «узнает» углеводную компоненту (остатки маннозы) пептидов, образуется комплекс в присутствии ионов кальция (рис. 2). Образование такого комплекса приводит к изменению активности РП. В некоторых случаях происходит значительное уменьшение активности РП, например, это показано для биорегулятора, выделенного из сыворотки крови [10]. В случае других биорегуляторов, например, выделенных из тканей заднего сектора глаза, образование комплекса вызывает увеличение активности РП и проявление ее в СМД [11].



Рис. 2. Механизм взаимодействия регуляторных пептидов с их модуляторами, лежащий в основе образования и функционирования биорегуляторов данной группы

Согласно нашим представлениям, взаимодействие между РП и белками-модуляторами лежит в основе самосборки структуры МГТБ, которые являются «тонкими настройщиками» органа-тканевого гомеостаза, то есть обеспечивают регуляцию биологических процессов, проявляя свойства тканевой, но не видовой специфичности действия. В этом аспекте следует привести экспериментально полученные

данные об исследовании пептидной компоненты, выделенной из различных тканей глаза быка. Несмотря на то, что эти ткани глаза: роговица, хрусталик, стекловидное тело, радужка, сетчатка и др., выполняют различные функции и имеют разное строение, в состав биорегуляторов, выделенных из каждой ткани глаза, входят несколько одинаковых пептидов (табл. 1).

Таблица 1

**Пептидный состав биорегуляторов, выделенных из различных тканей глаза.
Перечень сигналов масс-спектров пептидов**

№	Источник	M (m/z)	Концентрация (мг/мл)
1	Сетчатка глаза быка <i>Bos taurus taurus</i>	4302, 4528, 4819, 8603	0,068
2	Хрусталик глаза быка <i>Bos taurus taurus</i>	4302, 4529, 4817, 8604	0,0041
3	Стекловидное тело глаза быка <i>Bos taurus taurus</i>	4300, 4370, 4420	0,081

Продолжение Табл. 1

№	Источник	M (m/z)	Концентрация (мг/мл)
4	Радужка глаза быка <i>Bos taurus taurus</i>	3944, 4301	0,083
5	Цилиарное тело глаза быка <i>Bos taurus taurus</i>	4301	0,068
6	ПЭ глаза быка <i>Bos taurus taurus</i>	4303, 4532, 4819	0,0017
7	Склера глаза быка <i>Bos taurus taurus</i>	4171, 4302, 4531, 4819	0,039
8	Роговица глаза быка <i>Bos taurus taurus</i>	1442, 3376, 3973, 4302, 4418, 4531, 4817, 8604	0,0105

Важно отметить, что в литературе отсутствуют данные о синтезе гликопептидов в тканях высших животных. В связи с этим, можно предположить, что РП являются продуктами постоянно протекающего в межклеточном пространстве тканей протеолиза белков, в том числе гликопротеинов.

Известно, что суперсемейство матричных металлопротеаз (ММП), включающее в себя более 28 представителей, а также семейство ингибиторов данных ферментов (ТИМР) постоянно осуществляют модификацию ВКМ за счет протеолиза его белков [12]. В литературе имеются данные, показывающие, что продукты протеолиза белков ВКМ играют

большую роль в дифференцировке и пролиферации клеток [13]. Согласно предложенной нами концепции, продукты протеолиза собираются в ассоциаты, которые являются биологически активными. Большую роль в этом процессе играют белки-модуляторы. Мы предполагаем, что белки-модуляторы (в некоторых случаях они представлены неизученными изоформами сывороточного альбумина) проявляют свойства шаперонов – осуществляют организацию и «упаковку» пептидов, которые приобретают вторичную структуру, преимущественно содержащую различные β -элементы и статистический клубок (табл. 2).

Таблица 2

Вторичная структура регуляторных пептидов, входящих в состав биорегуляторов

Источник выделения биорегуляторов (из тканей крупного рогатого скота)	α -спираль, %	β -складки (антипараллельные), %	β -складки (параллельные), %	β -изгибы, %	Статистический клубок, %
Пигментный эпителий глаза	7,6 ± 0,5	37,4 ± 0,5	5,7 ± 0,5	18,9 ± 0,5	30,4 ± 0,5
Сетчатка	7,4 ± 0,5	40,0 ± 0,5	5,2 ± 0,5	18,4 ± 0,5	31,0 ± 0,5
Хрусталик	6,8 ± 0,5	40,4 ± 1,0	5,2 ± 0,5	18,5 ± 1,0	30,8 ± 1,0
Сыворотка крови	8,0 ± 0,5	40,1 ± 0,5	2,0 ± 0,5	16,9 ± 0,5	33,0 ± 0,5
Легкое	2,2 ± 0,5	48,1 ± 0,5	3,7 ± 0,5	16,7 ± 0,5	29,3 ± 0,5
Печень	2,2 ± 0,5	48,1 ± 0,5	3,7 ± 0,5	16,7 ± 0,5	29,3 ± 0,5
Желчь	2,2 ± 0,5	48,3 ± 0,5	3,7 ± 0,5	16,7 ± 0,5	29,1 ± 0,5
Молоко	6,2 ± 0,5	45,7 ± 0,6	3,6 ± 0,8	16,0 ± 1,1	28,5 ± 3,2
Предстательная железа	6,4 ± 0,1	47,1 ± 0,2	3,7 ± 0,3	14,1 ± 0,1	28,7 ± 1,5

Следует отметить особую роль изоформ альбумина сыворотки крови, которые были обнаружены как белки-модуляторы, входящие в состав нескольких МГТБ. Известно, что семейство сывороточного альбумина включает в себя несколько десятков членов. До сих пор их функция оставалась совершенно неизученной. Согласно предложенной нами концепции, многочисленные изоформы сывороточного альбумина могут быть ответственны за регуляцию процессов органно-тканевого гомеостаза, входя в состав МГТБ и функционируя как шапероны в межклеточном пространстве соответствующей ткани. Такое поведение сывороточного альбумина (подобно шаперону) показано в литературе [14]. Мы полагаем, что изоформы альбумина могут проникать избирательно в межклеточ-

ное пространство соответствующего органа через гемато-органные барьеры, которые пропускают только специфический для данного органа альбумин. Это предположение подкрепляется результатами исследования альбуминов, входящих в состав МГТБ. Так, например, методами масс-спектрометрии было показано, что альбумины, входящие в состав нескольких МГТБ, имели различные значения молекулярных весов [4, 15].

Важнейшим свойством МГТБ является их способность образовывать крупные наноразмерные частицы даже в очень разбавленных растворах (рис. 3, 4) [4–7, 16]. Надо отметить, что экспериментально была показана зависимость между наноразмерным состоянием МГТБ и проявлением их активности в СМД [11].

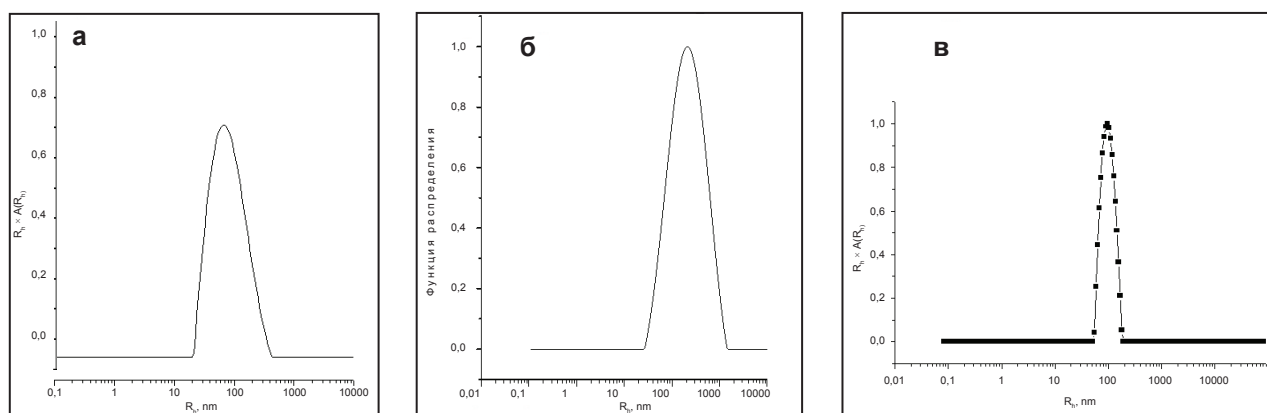


Рис. 3. Лазерное динамическое светорассеивание растворов, содержащих биорегулятор, выделенных из: а) молока ($R_h = 87,8 \pm 10,1$ нм); б) ПЭ ($R_h = 205,5 \pm 11,3$ нм); в) роговицы ($R_h = 130,5 \pm 12,4$ нм); R_h – величина гидродинамического радиуса при величине угла рассеяния 0°

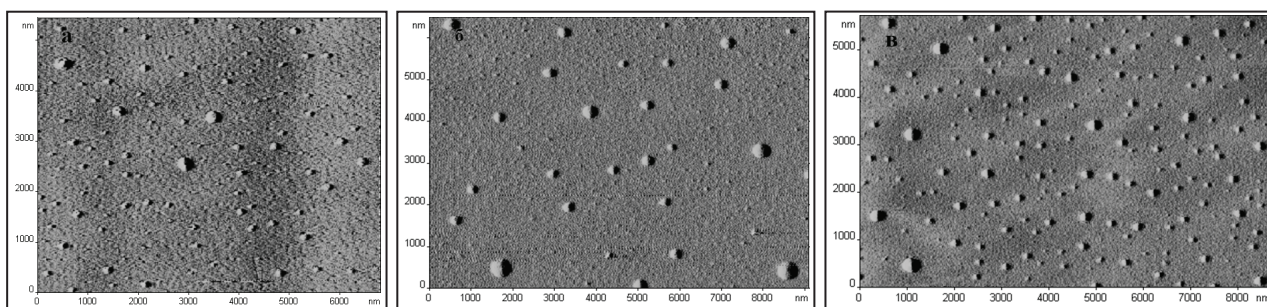


Рис. 4. Атомно-силовая микроскопия растворов биорегуляторов, выделенных из: а) хрусталика (110–200 нм); б) ПЭ (150–300 нм); в) сетчатки (120–170 нм)

Очевидно, это свойство МГТБ непосредственно связано с их способностью влиять на структуру воды. Это было показано ранее различными физико-химическими ме-

тодами: ИК-спектроскопия, ЯМР, лазерное динамическое светорассеивание [17]. Было высказано предположение о том, что в основе механизма действия биорегуляторов

данной группы в СМД лежит способность изменять структуру воды в растворе [18]. Согласно нашим представлениям, МГТБ, присутствующие в виде «малого» матрикса в межклеточном пространстве, обеспечивают прохождение регуляторного сигнала по ткани за счет перевода воды в определенное состояние. Именно в этом состоянии вода функционирует как «информационная матрица». Любое воздействие небольшого количества сигнальных молекул вызывает локально ее изменение – образование новых структур воды, которое быстро распространяется по межклеточному пространству тканей, вызывая изменения конформации соответствующих рецепторов. Через некоторое время это «возмущение» в виде образования локальной новой структуры воды исчезает, и вода вновь переходит за счет взаимодействия с МГТБ в свое постоянное состояние «информационной матрицы».

Результаты этого исследования объясняют также уникальное свойство биорегуляторов данной группы дополнительно активировать клеточные источники регенерации, вызывая тем самым стимуляцию процессов восстановления и репарации [9].

Поэтому в настоящем исследовании была предпринята попытка изучить мембранотропную активность двух экстрактов, выделенных из печени и легкого крыс, в состоянии «мнимых» растворов, полученных при разведении соответствующего тканевого экстракта в 10^{50} раз. Исследование проводили на свежеприготовленной органной культуре ткани печени или легкого мыши после кратковременной инкубации (20 мин). На первом этапе данной экспериментальной серии были исследованы растворы тканевых экстрактов в СМД, которые были получены разбавлением исходных растворов в 10^{12} раз.

Результаты этого исследования показывают, что экстракты тканей печени и легкого крыс в СМД проявляют мембранотропную активность (табл. 1).

Как видно из результатов, приведенных в табл. 2, оба экстракта проявляли этот вид биологической активности, причем сохранялся ее тканеспецифический характер.

Полученные данные указывают на присутствие в «мнимых» растворах экстрак-

тов печени и легкого крыс структур воды, оказывающих биологическое действие. Это согласуется с современными представлениями о способности молекул воды образовывать структуры под действием физико-химических факторов.

В пользу этого предположения свидетельствуют результаты следующей экспериментальной серии, в которой действию ультразвука были подвергнуты растворы экстрактов в СМД и в «мнимых» растворах. Было показано, что после ультразвукового воздействия растворы экстрактов в СМД сохраняли мембранотропную активность, имеющую тканеспецифический характер. Однако в состоянии «мнимых» растворов тканевые экстракты утрачивали способность оказывать влияние на свойства плазматической мембраны клеток после ультразвукового воздействия. Полученные данные предполагают, что биорегуляторы, присутствующие в экстрактах печени и легкого, способствуют образованию биологически активных структур воды, которые могут необратимо разрушаться при ультразвуковом воздействии.

Следует отметить очень важный экспериментальный результат, который был получен в этом исследовании. Работа на двух тканевых культурах позволила оценить биологическую активность образующихся в «мнимых» растворах структур воды, которые оказывают такое же тканеспецифическое действие, как и биорегуляторы данной группы в СМД.

В данном случае, возможно, что тканеспецифические кластеры обладают различной организацией, свойственной данному типу ткани. Также вероятно, что существует несколько видов «стандартных» кластеров, присутствующих во всех растворах, и их сочетание определяет тканеспецифический характер биологически активных веществ.

На основании полученных результатов можно предположить, что в основе биологического действия биорегуляторов данной группы как в СМД, так и в «мнимых» растворах, лежит их способность участвовать в образовании кластеров воды, различающихся по структуре.

Мембранотропная активность тоже тканеспецифична – это показано для печени и легкого крыс.

Таблица 3

**Мембранотропная активность (Ма) экстрактов печени и легкого крыс
в сверхмалых дозах на органных культурах ткани**

Исследуемый раствор	Мембранотропная активность экстрактов печени и легкого крыс в сверхмалых дозах на органных культурах ткани (Ма, %)					
	До озвучивания		Воздействие ультразвуком			
			Через 1 час		Через неделю	
	Печень	Легкое	Печень	Легкое	Печень	Легкое
Экстракт печени крысы	141,0* ± 7,06	104,24 ± 5,16	138,34* ± 5,16	—**	—**	—**
Экстракт легкого крысы	108,36 ± 5,25	162,0* ± 8,1	—**	16,7 ± 0,5	29,3 ± 0,5	—**

* – отмечены статистически достоверные результаты ($p < 0,05$);

** – мембранотропную активность не определяли.

Таблица 4

**Мембранотропная активность (Ма) экстрактов печени и легкого крыс
в «мнимых» растворах**

Исследуемый раствор	Мембранотропная экстрактов печени и легкого крыс в «мнимых» растворах (%)					
	До озвучивания		Воздействие ультразвуком			
			После воздействия		Через неделю после воздействия	
	Печень	Легкое	Печень	Легкое	Печень	Легкое
Органная культура ткани						
Экстракт печени крысы	139,87* ± 6,95	102,24 ± 5,62	103,11 ± 5,15	—**	105,3 ± 5,76	—**
Экстракт легкого крысы	105,28 ± 5,25	144,31* ± 7,12	—**	102,15 ± 4,54	—**	108,37 ± 5,42

Таким образом, мы показали, что биологическое действие изучаемых биорегуляторов тканеспецифично, но не видоспецифично.

В качестве примера далее приведена тканеспецифическая активность ранозаживления кожи мыши *in vivo*. Оказалось, что из исследуемых биорегуляторов, как показано на рис. 5, активными являются биорегуляторы, выделенные из сыворотки крови, подорожника, алоэ, хрусталика, жемчужницы; в случае же применения биорегуляторов, выделенных из роговицы, кабачков, почек, сетчатки эффект был как в контрольной группе с физиологическим раствором. Причем действие различных биорегуляторов было акцентировано на определенные структуры кожи при применении различных биорегуляторов, что говорит о тканеспецифичности их действия.

В контроле в центральной части раны наблюдали образование очага хронического воспаления и формирование соединительнотканного

рубца в дерме, отмечали отсутствие полной реэпителизации, отмечалось нарушение адгезионных взаимодействий между эпителием и дермой, не наблюдалось восстановления протоков желез. В дерме происходило образование рубцовой ткани; подкожная жировая ткань была плохо выражена (рис. 5 а, д, е).

В опытных группах с активными биорегуляторами наблюдали совершенно иную картину репарации кожи: сильное стягивание краев раны и практически полную ее реэпителизацию (кроме использования биорегулятора из хрусталика), более выраженную, чем у животных контрольной группы (восстанавливались все слои многослойного эпителия). Отмечали отсутствие очагов воспаления.

Структура дермы почти восстановлена, отмечено поддержание адгезивных взаимодействий между эпителием и дермой, соединительная ткань была менее уплотненной по сравнению с тканью мышей контрольной группы.

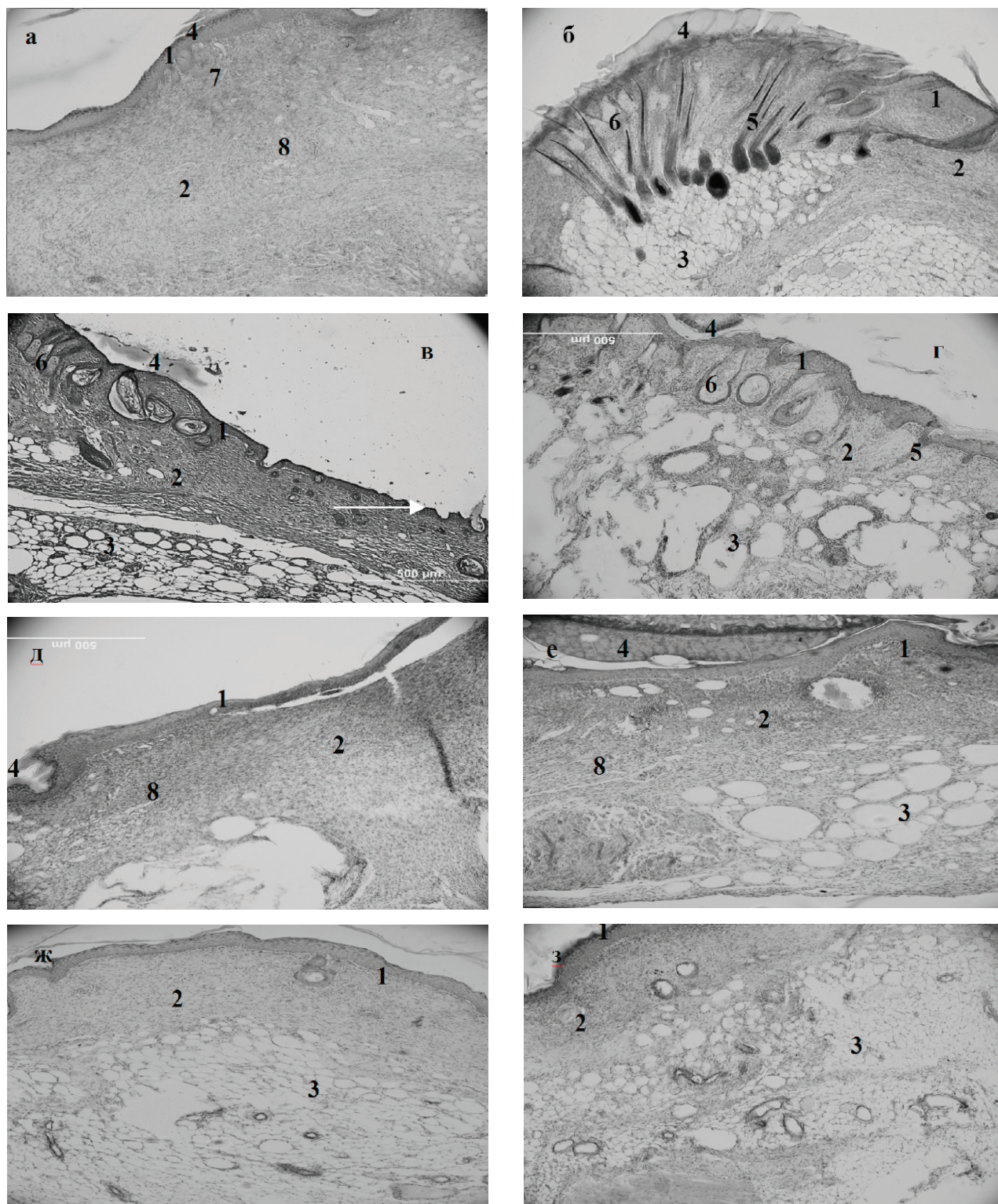


Рис. 5. Модель экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo* при обработке раны: а) физ. раствором; б) биорегулятором сыворотки крови в дозе 10–12 мг белка/мл; в) биорегулятором жемчужницы в дозе 10–10 мг белка/мл; г) биорегулятором хрусталика в дозе 10–12 мг белка/мл; д) биорегулятором роговицы в дозе 10–11 мг белка/мл; е) биорегулятором сетчатки в дозе 10–10 мг белка/мл; ж) биорегулятором подорожника в дозе 10–12 мг белка/мл; з) биорегулятором алоэ в дозе 10–10 мг белка/мл (Ув. ок. $\times 10$, об. $\times 10$); 1 – эпидермис; 2 – дерма; 3 – подкожная жировая ткань; 4 – струп; 5 – волосяные фолликулы; 6 – сальные железы; 7 – очаг воспаления; 8 – фиброзный рубец

В дерме (особенно под раной) и в подкожной ткани отмечено восстановление многочисленных протоков потовых желез (в случае применения биорегуляторов подорожника, алоэ, хрусталика и сыворотки крови) и волосяных фолликулов (в случае биорегуляторов из сыворотки крови и хрусталика). В случае применения биорегуляторов из сыворотки крови, хрусталика и жемчужницы происходило восстановление сальных желез в дерме. Жировая ткань сильно развита (особенно в случае применения биорегуляторов из подорожника и алоэ). В отдельных участках под раной отмечено частичное восстановление мышечных элементов (в случае применения биорегулятора из сыворотки крови). То есть, в случае действия активных биорегуляторов наблюдалось полное восстановление нормальной структуры ткани кожи (рис. 5 б, в, г, ж, з). Эти данные полностью соответствуют результатам ранее проведенного исследования, свидетельствующего о ранозаживляющем действии сывороточного МГТБ [8]. У мышей с

использованием биорегулятора из жемчужницы наблюдали стимуляцию ранозаживления, восстановительные процессы происходили по иному механизму, чем у мышей с биорегулятором из сыворотки крови, подорожника и алоэ. В дерме наблюдали сальные железы и эпителиальные структуры, которые мигрировали к эпидермису, образуя характерные «столбики» эпителия (отмечено стрелкой). Следует отметить, что картина регенерации кожи у мышей данной группы была сходной с таковой у мышей мутантной линии Hr^{hr}/Hr^{hr} на модели экспериментального ожога *in vivo* [19]. Мутация в гене *Hr* вызывает нарушение волосяных фолликулов, образовавшихся в эмбриогенезе, и приводит к полному облысению животных. Обнаруженная аналогия может быть объяснена отсутствием волосяных фолликулов у моллюсков, вследствие чего наблюдается другой механизм репарации кожи, в отличие от млекопитающих, у которых стволовой отдел эпителиальных и мезенхимных клеток связан с волосяными фолликулами.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют в пользу высказанной нами ранее концепции о присутствии во всех живых организмах определенного механизма биорегуляции, основанного на структурных перестройках воды. На наш взгляд, данный механизм лежит в основе феномена действия физико-химических факторов в СМД. Значительная сложность в исследовании этого вопроса связана с тем, что вода в живых организмах принципиально отличается

от воды «свободного» объема – предмета многих исследований, проводимых физико-химическими методами. Тем не менее, обнаружение данной группы биорегуляторов, которые, на наш взгляд, участвуют в образовании «малого» матрикса межклеточного пространства тканей, позволяет моделировать многие процессы, происходящие в живых организмах, и, тем самым, более глубоко изучать данный механизм биорегуляции.

Список использованных источников

1. Stepanek, P. Dynamic Light Scattering. The method and some applications // Ed. By Brown W. – Oxford: Clarendon Press, 1993. – P. 177.
2. Filinov, A.S., Dubrovin, E.V., Gavrillko, D.Yu., Meshkov, G.B., Yaminsky, I.V. FemtoScan Online – A Combination of Probe Microscopy and Internet Technologies // Proceedings of International Workshop “Scanning Probe Microscopy-2002”, Nizhny Novgorod, Russia, March 3–6. – 2002. – P. 64–66.
3. Ямскова, В.П., Резникова, М.М. Низкомолекулярный полипептид сыворотки крови теплокровных: влияние на клеточную адгезию и пролиферацию // Журнал общей биологии. – 1991. – Т. 52, № 2. – С. 181–191.
4. Borisenko, A.V., Yamskova, V.P., Krasnov, M.S., Blagodatskikh, I.V., Vecherkin, V.V., Yamskov, I.A. Regulatory proteins from the mammalian liver that display biological activity at ultra low doses / Ed. by Varfolomeev S.D. [et al.] // Biochemical Physics Frontal Research. – Hauppauge NY: Nova Science Publishers Inc., 2007. – P. 35–45.
5. Krasnov, M.S., Gurmizov, E.P., Yamskova, V.P., Yamskov, I.A. Analysis of a Regulatory Peptide from the Bovine Eye Lens:

Physicochemical Properties and Effect on Cataract Development *in vitro* and *in vivo* / Ed. by Varfolomeev S.D. [et al.] // Biochemical Physics Frontal Research. – Hauppauge NY: Nova Science Publishers Inc, 2007. – P. 21–33.

6. Margasyuk, D.V., Krasnov, M.S., Blagodatikh, I.V., Grigoryan, E.N., Yamskova, V.P., Yamskov, I.A. Regulatory Protein from Bovine Cornea: Localization and Biological Activity / Ed. by Varfolomeev S.D. [et al.] // Biochemical Physics Frontal Research. – Hauppauge NY: Nova Science Publishers Inc. – 2007. – P. 47–59.

7. Nazarova, P.A., Yamskova, V.P., Krasnov, M.S., Filatova, A.G., Yamskov, I.A. Regulatory proteins biologically active in ultralow doses from mammalian glands and their secretions / Ed. by Varfolomeev S.D. [et al.] // New Trends in Biochemical Physics Research. – Hauppauge NY: Nova Science Publishers Inc., 2007. – P. 73–82.

8. Yamskova, V.P., Krasnov, M.S., Rybakova, E.Yu., Vecherkin, V.V., Borisenko, A.V., Yamskov, I.A. Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 2. Tissue localization and role in wound healing / Ed. by Varfolomeev S.D. [et al.] // Biochemical Physics Frontal Research. – Hauppauge NY: Nova Science Publishers Inc., 2007. – P. 71–78.

9. Ямскова, В.П., Краснов, М.С., Ямсков, И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 127 с.

10. Ямскова, В.П., Рыбакова, Е.Ю., Виноградов, А.А., Вечеркин, В.В., Ямсков, И.А. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 4. – С. 407–413.

11. Ямскова, В.П., Скрипникова, В.С., Молявка, А.А., Ильина, А.П., Краснов, М.С., Маргасюк, Д.В., Борисенко, А.В., Березин, Б.Б., Кузнецова, Е.С., Буряк, А.К., Ямсков, И.А. Структурно-функциональные особенности нового биорегулятора, выделенного из ткани пигментного эпителия глаза быка // Биохимия. – 2009. – Т. 74, № 9. – С. 1195–1203.

12. Pytliak, M., Vargova, V., Mechirova, V. Matrix metalloproteinases and their role in oncogenesis: a review // Onkologie. – 2012. – V. 35. – P. 49–53.

13. Chaussain, C., Eapen, A.S., Huet, E., Floris, C., Ravindran, S., Hao, J., Menashi, S., George, A. MMP2-cleavage of DMP1 generates a bioactive peptide promoting differentiation of dental pulp stem/progenitor cell // Eur Cell Mater. – 2009. – V. 18. – P. 84–95.

14. Marini, I., Moschini, R., A. Del Corso, Muka, U. Chaperone-like features of bovine serum albumin: a comparison with alpha-crystallin // Cell. Mol. Life Sci. – 2005. – V. 62. – P. 3092–3099.

15. Ильина, А.П., Куликова, О.Г., Мальцев, Д.И., Краснов, М.С., Рыбакова, Е.Ю., Скрипникова, В.С., Кузнецова, Е.С., Буряк, А.К., Ямскова, В.П., Ямсков, И.А. Идентификация новых пептидов из межклеточного пространства методом MALDI-TOF масс-спектрометрии // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 2. – С. 135–140.

16. Yamskova, V.P., Rybakova, E.Yu., Vecherkin, V.V., Berezin, B.B., Filatova, A.G., Blagodatikh, I.V., Yamskov, I.A. Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 1. Isolation, purification and physicochemical properties / Ed. by Varfolomeev S.D. [et al.] // Biochemical Physics Frontal Research. – Hauppauge NY: Nova Science Publishers Inc., 2007. – P. 61–70.

17. Ямсков, И.А., Ямскова, В.П., Даниленко, А.Н., Клеменкова, З.С., Антипов, Б.Г., Черников, Ф.Р., Гусынина, М.М., Рыбакова, Е.Ю. Экспериментальные доказательства роли физико-химических факторов в механизме биологического действия сверхмалых доз // Российский химический журнал (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). – 1999. – Т. 43, № 5. – С. 34–39.

18. Ямскова, В.П., Ямсков, И.А. Механизм биологического действия физико-химических факторов в сверхмалых дозах // Российский химический журнал ЖРХО им. Д.И. Менделеева. 1999. – Т. 43, № 2. – С. 74–79.

19. Колокольчикова, Е.Г. Жиркова, Е.А., Головатенко-Абрамов, П.К., Платонов, Е.С., Бочарова, В.С., Хватов, В.Б. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 1. – С. 47–54.

Дата поступления статьи 17 сентября 2012 г.

*Е.Э. Хейдорова¹, *Г.Г. Хрисанфова², Е.И. Бычкова¹, С.К. Семенова², М.Е. Никифоров¹

ПОЛИМОРФИЗМ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА *COX1* В ПОПУЛЯЦИИ МАРИТ ТРЕМАТОД *BILHARZIELLA POLONICA* (СЕМ. *SCHISTOSOMATIDAE*), ПАРАЗИТИРУЮЩИХ У ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ НА ОЗЕРЕ НАРОЧЬ

¹ГНПО «Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²Институт биологии гена Российской академии наук
Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

* – оба автора внесли равный вклад в данное исследование

Введение

Полиморфизм митохондриальной ДНК широко используется в филогенетических исследованиях животных различных таксономических групп. В отличие от ядерной ДНК, митохондриальные гены (мт гены) наследуются по материнской линии и обладают более быстрыми темпами эволюции, что приводит к накоплению различий между популяциями одного вида и даже между близкородственными видами [1, 2, 3], которые были разделены лишь в течение короткого промежутка времени [4]. Именно на этих особенностях мт генов базируется филогеография, основной задачей которой является выявление генеалогических групп или линий и исследование их географического распространения [5, 6]. Наиболее популярными молекулярными маркерами для данных исследований являются последовательности генов цитохрома *b* (*cyt b*) и одной из субъединиц цитохромоксидазного комплекса – *cox1*. Оба эти гена предложено использовать в международной программе по идентификации всех видов растений и животных “*Barcoding of life*” [7].

Данная работа посвящена молекулярно-генетическому анализу внутривидовой структуры взрослых особей (марит) одного из наименее изученных видов кровяных сосальщиков – птичьей шистосомы *Bilharziella polonica* – озера Нарочь, впервые проводимому на основе полиморфизма митохондриального гена *cox1* (COI).

Род *Bilharziella*, относящийся к семейству *Schistosomatidae* (класс *Trematoda*), является монотипическим с единственным представителем – видом *Bilharziella polonica* (Ко-

walewsky, 1895) Looss, 1899. Показано, что для отдельных популяций этого вида характерна морфологическая и генетическая неоднородность. Так, в отдельных европейских популяциях отмечалась высокая морфологическая сезонная изменчивость в размерах и пропорциях тела паразита, форме и вооруженности присосок, структуре полового аппарата и др. [8], которая может быть связана с изменением гормонального фона у дефинитивных хозяев [9–11], временем инфекции, зрелостью и возрастом самих гельминтов, а также с размерами их хозяев [8]. Кроме того, выявлена генетическая неоднородность церкариальных изолятов *B. polonica* из нескольких водоемов Беларуси, заключающаяся в наличии двух гаплотипических линий по гену *cox1* [12].

Патогенный статус данного вида также вызывает споры. Фуркоцеркарии бильхарциелл описаны как возбудители церкариальных дерматитов в Германии [13], Чехии [14], России [15] и Беларуси [16]. Петр Хорак и Любуше Коляржова [17] наблюдали проникновение церкарий этого вида в кожу хвоста и конечностей мышей, причем шистосомулы не погибали и мигрировали в легкие экспериментальных животных. С другой стороны, участие *B. polonica* в функционировании очагов церкариальных дерматитов в Польше не было подтверждено [18].

Таким образом, данный вид является недостаточно изученным по многим важным биологическим аспектам, выяснение которых может способствовать оптимизации конкретных мер по борьбе с очагами бильхарциоллеза и церкариоза.

Материалы и методы

Взрослые особи (мариты) *B. polonica* ($n = 36$ экз.) были собраны в 2007–2009 гг. от 11 водоплавающих птиц 3 видов, гнездящихся на озере Нарочь. 22 мариты *B. polonica* получены от 6 особей кряквы (*Anas platyrhynchos*), 6 марит – из 2 особей хохлатой чернети (*Aythya fuligula*) и 8 марит – от 3 особей большой поганки (*Podiceps cristatus*). Марит фиксировали в 96% этаноле и хранили при +4 °С.

Аmplификацию митохондриального гена *cox1*

проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 62 мМ Трис-НСl; 15,4 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% Tween-20; 5 мМ MgCl_2 ; 0,36 мМ каждого dNTP; по 0,6 pmol предложенных А. Локер с соавторами [19] праймеров *Cox1_schist_5ab* (5'-TCTTTTRGATCATAAGCG-3' (R-G/A)) и *Cox1_schist_3ab* (5'-TAATGCATMGGAAAAAACA-3' (M-A/C)); 0,6 единиц *Taq*-полимеразы ("Dialat", Москва) и 10–100 нг ДНК. Условия проведения ПЦР представлены в табл. 1.

Таблица 1

Температурный и временной режимы проведения ПЦР

Название этапа ПЦР	Температура (°С), количество циклов	Время	
Предварительная денатурация	94	2 мин	
Денатурация	94	40 циклов	
Отжиг	52		30 с
Элонгация	72		2 мин
Достройка цепей	72	7 мин	

Аmplифицированные фрагменты ДНК элюировали из геля с использованием набора реагентов *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, USA). Секвенирование ДНК осуществляли с помощью набора реактивов *ABI PRISM BigDye™ Terminator v.3.1* и последующим анализом на Автоматическом секвенаторе *ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» Института молекулярной биологии РАН (г. Москва).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей, определение нуклеотидного и аминокислотного состава, оценка нуклеотид-

ного (π) и гаплотипического (h) разнообразия, *D*- и *Z*- тесты на нейтральность нуклеотидных замен и определение возможного времени дивергенции, а также реконструкцию филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия (*ML*) осуществляли с помощью пакета программ *MEGA ver. 5.05* [20]. Для построения парсимониальной сети использовали программу *TCN 1.21* [21]. Для сравнительного анализа привлечены депонированные в *GenBank* последовательности *cox1* одной мариты *B. polonica* (AY157186) из Украины, а также *Trichobilharzia regenti* (HM439504.1), *T. szidati* (JF838202.1).

Результаты и обсуждение

Длина исследованного фрагмента *cox1* для всех 36 марит *B. polonica* составила 1125 п.н. (375 аминокислот). В нуклеотидных последовательностях не обнаружено инсерций, делеций и стоп-кодонов, что свидетельствует об отсутствии среди изученных образцов ДНК ядерных копий *cox1*.

В нуклеотидном составе данного гена показано значительное преобладание АТ-оснований, соотношение АТ/ГС-пар составило 68,9/31,1%. Нуклеотидная последовательность *cox1* содержит 32 полиморфных сай-

та, что составляет 2,84% от общей длины анализируемого фрагмента. Из них только девять (0,8%) являются парсимониально информативными. На изученном ареале среди 36 марит обнаружено 19 гаплотипов (табл. 2).

В полученных нуклеотидных последовательностях наиболее часто наблюдаются транзиции пуриновых оснований ($A \rightarrow G - 41,57\%$; $G \rightarrow A - 45,3\%$). Значительно реже отмечают пиримидин-пиримидиновые замещения ($T \rightarrow C - 0,13\%$; $C \rightarrow T - 0,59\%$).

Таблица 2

Полиморфизм гаплогенов *cox1* среди марит *B. rolonica* озера Нарочь

Гаплоген	COXI																																		
	81	225	229	237	312	321	339*	366	387*	492	495	516	567*	603	681	682	684	702	717*	726	738	784	819	849*	876	885	899	906*	945	963	1053	1101			
G1 (9)	G	A	G	G	A	A	G	A	T	G	G	T	T	A	A	C	A	T	G	T	A	G	A	A	A	C	C	G	T	A	G	G	A		
G2 (3)	
G3 (2)	A	
G4 (1)	G	A	
G5 (1)	C	
G6 (1)	
G7 (1)	T	
G8 (1)	G	C	
G9 (1)	G	T	
G10 (3)	G	
G11 (1)	G	
G12 (1)	G	C
G13 (4)	T
G14 (1)	A	A	A	G	.	.	.	G
G15 (1)	A	A	G	.	.	.	G
G16 (2)	A	A	G	.	.	.	G
G17 (1)	A	A	G	.	.	.	G
G18 (1)	A	A	G	.	.	.	G	G
G19 (1)	.	.	A	A	A	A	.	.	G	.	.	.	G	C	A	
$\Sigma=19$.	.	A	A	A	A	G	.	G	

Примечание:

1. Жирным шрифтом выделены парсимониально информативные сайты;
2. Звездочкой отмечены сайты, мутации по которым вызваны трансверсиями;
3. Затемнением выделены сайты, мутации в которых привели к несинонимичным заменам;
4. В скобках после названия гаплогена указано число особей с этим гаплогеном.

Частоты трансверсий не превышают 3% ($A/G \rightarrow T - 2,85\%$; $A/G \rightarrow C - 0,62\%$; $T/C \rightarrow A - 1,43\%$; $T/C \rightarrow G - 1,31\%$). Общее соотношение транзиции/трансверсии составляет 6,3. На нейтральность обнаруженных замен в последовательностях *cox1* указывают результаты сравнения средних значений числа нуклеотидных различий ($D = -1,368$) и отношения синонимичных и несинонимичных замен ($Z < 0,05$) при попарном сравнении последовательностей.

В большинстве случаев нуклеотидные замены вызваны транзициями в третьем положении кодонов и являются синонимичными. Однако транзиции $G \rightarrow A$ в положениях 229 (*G19*), 784 (*G12*), 899 (*G2*) и трансверсия $G \rightarrow T$ в сайте 339 (*G12*) приводят к несинонимичным заменам. Так, замена гуанина на аденин в первом положении кодона в гаплотипе *G19* (марита *Pc8*) привела к замещению валина метионином в 77 положении аминокислотной последовательности. Результатом транзиции во втором положении кодона, ответственного за аргинин, в гаплотипе *G2* (3 мариты – *Ap4a*, *Ap4b*, *Ap4c*) было появление аминокислоты гистидина в 300 положении. Следует особо отметить, что в нуклеотидной последовательности гаплотипа *G12* (марита *Pc1d*) произошли сразу 2 несинонимичные замены. Трансверсия в третьем положении кодона (339 сайт) и транзиция в первом положении (784 сайт) привели к замене лейцина на фенилаланин и валина на изолейцин в положениях 113 и 262 полипептидной последовательности, соответственно.

Наиболее часто в популяции водоплавающих птиц оз. Нарочь встречается гаплотип *G1* (25,0%), идентичный известной последовательности AY157186 из Украины, а также три гаплотипа: *G13* (11,11%), *G2* и *G10* (по 8,33%). Частота встречаемости остальных 15 гаплотипов не превышает 3%.

Следует отметить, что большинство гаплотипов *B. polonica* обладали приуроченностью к определенному виду водоплавающих птиц. Так, пять гаплотипов *G9*, *G12*, *G17*, *G18*, *G19* отмечены только у большой поганки; десять других гаплотипов *G2-G5*, *G7*, *G8*, *G11*, *G14-G16* – только у кряквы; и один гаплотип *G6* – только у хохлатой чернети. При этом, только два гаплотипа – *G1* и *G13* – были представлены у всех трех обследованных видов птиц,

а один гаплотип – *G10* – найден и у кряквы, и у хохлатой чернети. Возможно, такая не до конца выраженная гостальная специфичность связана с географической разобщенностью популяций специфических хозяев трематод *B. polonica* – моллюсков *Planorbarius corneus* и *Planorbis planorbis*.

Изоляция промежуточных хозяев обуславливает микроэволюционные процессы, происходящие в популяциях трематод. Можно предположить, что на географически удаленных друг от друга водоемах, посещаемых разными видами птиц, в популяциях местных моллюсков возникают и поддерживаются специфические географические расы церкарий *B. polonica*. Связь между изолированными популяциями моллюсков на отдельных водоемах поддерживается благодаря определенным видам птиц, которые в силу выраженности хоминга мигрируют между «родными» водоемами, объединяя их в единый ареал распространения мари́т *B. polonica* с характерными только для этих мест гаплотипами *cox1*. Для более определенных заключений по вопросам генетической дифференциации и микроэволюции птичьих шистосоматид *B. polonica* полученные нами результаты требуют дальнейшего подтверждения. Во-первых, на более объемных выборках мари́т из большего числа видов птиц. Во-вторых, необходимо провести специальные исследования различных популяций моллюсков на территории Беларуси и сопредельных стран из водоемов, расположенных по направлению основных пролетных путей водоплавающих птиц, с целью выяснения характера изменения соотношения различных гаплотипов *cox1*. Распределение гаплотипов в выборке мари́т *B. polonica*, обнаруженных у трех видов водоплавающих птиц, представлено в табл. 3.

В суммарной выборке мари́т *B. polonica*, выделенных из крякв (*A. platyrhynchos*), обнаружено 13 гаплотипов, и средняя величина гаплотипического разнообразия достигает 72,2%. Наибольшую представленность в инфрапопуляциях (группы особей паразита одного вида, обитающих в организме одной особи хозяина) мари́т у данного вида птиц имеют гаплотипы *G1* (22,7% от общей выборки; обнаружен у 5 мари́т из 4 особей кряквы), *G2* (13,6%; у 3 мари́т из 1 ос.), *G16* (9,1%; у 2 мари́т из 1 ос.), *G3* и *G13* (по 9,1%; по 2 мари́ты из 2 особей).

Таблица 3

Распределение гаплотипов *cox1* в выборке марит *B. polonica*, собранных от трех видов водоплавающих птиц (крякva, хохлатая чернеть, большая поганка) на озере Нарочь

Гаплотип	Мариты паразитов	Вид хозяина	Представленность	
			Мариты, экз.	%
G1	<i>Ap1d, Ap1b, Ap2b, Ap3a, Ap5a</i>	Крякva 1, 2, 3, 5	9	25,0
	<i>Af1a, Af1c</i>	Хохлатая чернеть 1		
	<i>Pc1b, Pc2a</i>	Большая поганка 1, 2		
G2	<i>Ap4a, Ap4b, Ap4c</i>	Крякva 4	3	8,33
G3	<i>Ap1a, Ap3b</i>	Крякva 1, 3	2	5,56
G4	<i>Ap2a</i>	Крякva 2	1	2,78
G5	<i>Ap6c</i>	Крякva 6	1	2,78
G6	<i>Af1b</i>	Хохлатая чернеть 1	1	2,78
G7	<i>Ap2c</i>	Крякva 2	1	2,78
G8	<i>Ap6b</i>	Крякva 6	1	2,78
G9	<i>Pc1c</i>	Большая поганка 1	1	2,78
G10	<i>Ap5b</i>	Крякva 5	3	8,33
	<i>Af2b, Af2c</i>	Хохлатая чернеть 2		
G11	<i>Ap3c</i>	Крякva 3	1	2,78
G12	<i>Pc1d</i>	Большая поганка 1	1	2,78
G13	<i>Ap1c, Ap4e</i>	Крякva 1,4	4	11,11
	<i>Af2a</i>	Хохлатая чернеть 2		
	<i>Pc1a</i>	Большая поганка 1		
G14	<i>Ap5c</i>	Крякva 5	1	2,78
G15	<i>Ap6a</i>	Крякva 6	1	2,78
G16	<i>Ap4d, Ap4f</i>	Крякva 4	2	5,56
G17	<i>Pc2b</i>	Большая поганка 2	1	2,78
G18	<i>Pc2c</i>	Большая поганка 2	1	2,78
G19	<i>Pc3</i>	Большая поганка 3	1	2,78

Ap – крякva *Anas platyrhynchos*, *Af* – хохлатая чернеть *Aythya fuligula*, *Pc* – большая поганка *Podiceps cristatus*

Остальные 8 гаплотипов (*G4*, *G5*, *G7*, *G8*, *G10*, *G11*, *G14* и *G15* – по 4,5%) лишь единожды регистрировались в инфрапопуляциях марит у птиц данного вида. Как видно из табл. 3, мариты, полученные нами от каждой кряквы, имели разные гаплотипы, т.е. инфрапопуляции марит оказались гетерогенными. В нуклеотидных последовательностях *cox1* у марит *B. polonica* из крякв, обнаружено 18 полиморфных сайтов, что составляет 1,6% от общей длины исследованного локуса, а нуклеотидное разнообразие π в данной выборке достигает 0,38%.

Из двух хохлатых чернетей (*A. fuligula*) было выделено 6 марит, причем обе инфрапопуляции также были гетерогенными. У паразитов

одной из чернетей обнаружены два гаплотипа – *G1* (33,3% от общей выборки; 2 мариты) и *G6* (16,7%; 1 марита), в другой – два других гаплотипа *G10* (33,3%; 2 мариты) и *G13* (16,7%; 1 марита). Указанные гаплотипы отличаются между собой по восьми полиморфным сайтам, что составляет среднее нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие в данной выборке 0,31 и 66,7%, соответственно.

Из трех больших поганок (*P. cristatus*) было выделено 8 марит. В суммарной выборке обнаружено 7 гаплотипов (*G1* – 25% от общей выборки, 2 мариты из 2 особей; *G9*, *G12*, *G13*, *G17*-*G19* – по 12,5%, по 1 марите), т.е. практически каждая взрослая особь *B. polonica* име-

ла свой индивидуальный гаплотип, что нашло выражение в высоком значении гаплотипического разнообразия (87,5%). Нуклеотидное разнообразие, также как и в выборках марит из других видов птиц, невысокое – 0,64%, однако в выборке паразитов из больших поганок обнаружено наибольшее число полиморфных сайтов (21).

Суммарная выборка паразитов из 11 птиц, относящихся к 3 видам, содержит 36 марит *B. polonica*, представляющих 19 гаплотипов, для которых характерно невысокое среднее нуклеотидное разнообразие ($\pi = 0,4\%$), а средняя величина гаплотипического разнообразия для последовательностей *cox1* достигает 52,78% (табл. 4).

Таблица 4

Полиморфизм *cox1* в выборках марит *B. polonica*, паразитирующих у водоплавающих птиц разных видов на озере Нарочь

Вид птицы	N	AT/GC	V	Pi, %	R	π , %	h, %	Ns	Nn	D	Z
Кряква (Ap)	22	68,9/ 31,1	18	9 (0,8)	14,8	0,38	72,2	17	1	-0,53	<0,05
Хохлатая чернеть (Af)	6	69,0/ 31,0	8	3 (0,3)	4,23	0,31	66,7	8	0	-0,06	
Большая поганка (Pc)	8	68,9/ 31,1	21	7 (0,6)	4,54	0,64	87,5	18	3	-0,55	
Общая выборка	36	68,9/ 31,1	32	9 (0,8)	6,30	0,40	52,8	28	4	-1,368	

N – число последовательностей; AT/GC – соотношение AT и GC-оснований; V – число варибельных сайтов; Pi (%) – число парсимониально информативных сайтов; R – отношение числа транзиций/трансверсий; π – среднее нуклеотидное разнообразие; h – среднее гаплотипическое разнообразие; Ns – число синонимичных замен и Nn – число несинонимичных замен; D, Z – значение D и Z- статистик

Дендрограмма генетических различий (рис. 1), построенная с помощью метода максимального правдоподобия (ML) с использованием модели Тамуры-Неи, указывает на надежное разделение всех рассматриваемых нами гаплотипов на две линии – А и В.

Линия А имеет в своем составе две достаточно обособленные подгруппы (ИБ = 56%). Подгруппа А1 включает 9 гаплотипов (G1–G9) и состоит из 20 последовательностей, 18 из которых надежно кластеризуются вместе с последовательностью AY157186 из Украины. В подгруппу А2, которую можно рассматривать как промежуточную между линиями А и В, входят 5 последовательностей (Ap3c, Ap5b, Af2b, Af2c, Pc1d), относящиеся к трем гаплотипам – G10, G11, G12. Таким образом, линия А состоит из 25 последовательностей и представлена 12 гаплотипами (G1–G12). Входящие в нее последовательности получены от марит *B. polonica* из 6 крякв, 2 хохлатых чернетей и 2 больших поганок.

Линию В (ИБ = 80%) образуют 7 гаплоти-

пов (G13–G19). Она включает 11 последовательностей, шесть из которых принадлежат маритам *B. polonica*, полученным из четырех крякв, четыре – из трех больших поганок и одна – из хохлатой чернети. Линия В подразделяется на 4 подгруппы (B1–B4), две из которых представлены уникальными гаплотипами (G15 и G19, мариты Ap6a и Pc3 соответственно), а две другие (ИБ > 60%) состоят из 3 и 5 последовательностей (Ap4d, Ap4f, Pc2c и Ap1c, Ap5c, Ap4e, Af2a, Pc1a, Pc2b) и представлены 5 гаплотипами (G16, G18 и G13, G14, G17).

Наличие в популяции марит *B. polonica* озера Нарочь двух гаплотипических линий гена *cox1* с разветвленной подструктурой, отражающей промежуточное положение подгруппы А2 (G10–G12), более наглядно подтверждается при использовании для филогенетической реконструкции парсимониальной сети (рис. 2).

Согласно этим построениям, наибольшая частота встречаемости характерна для гапло-

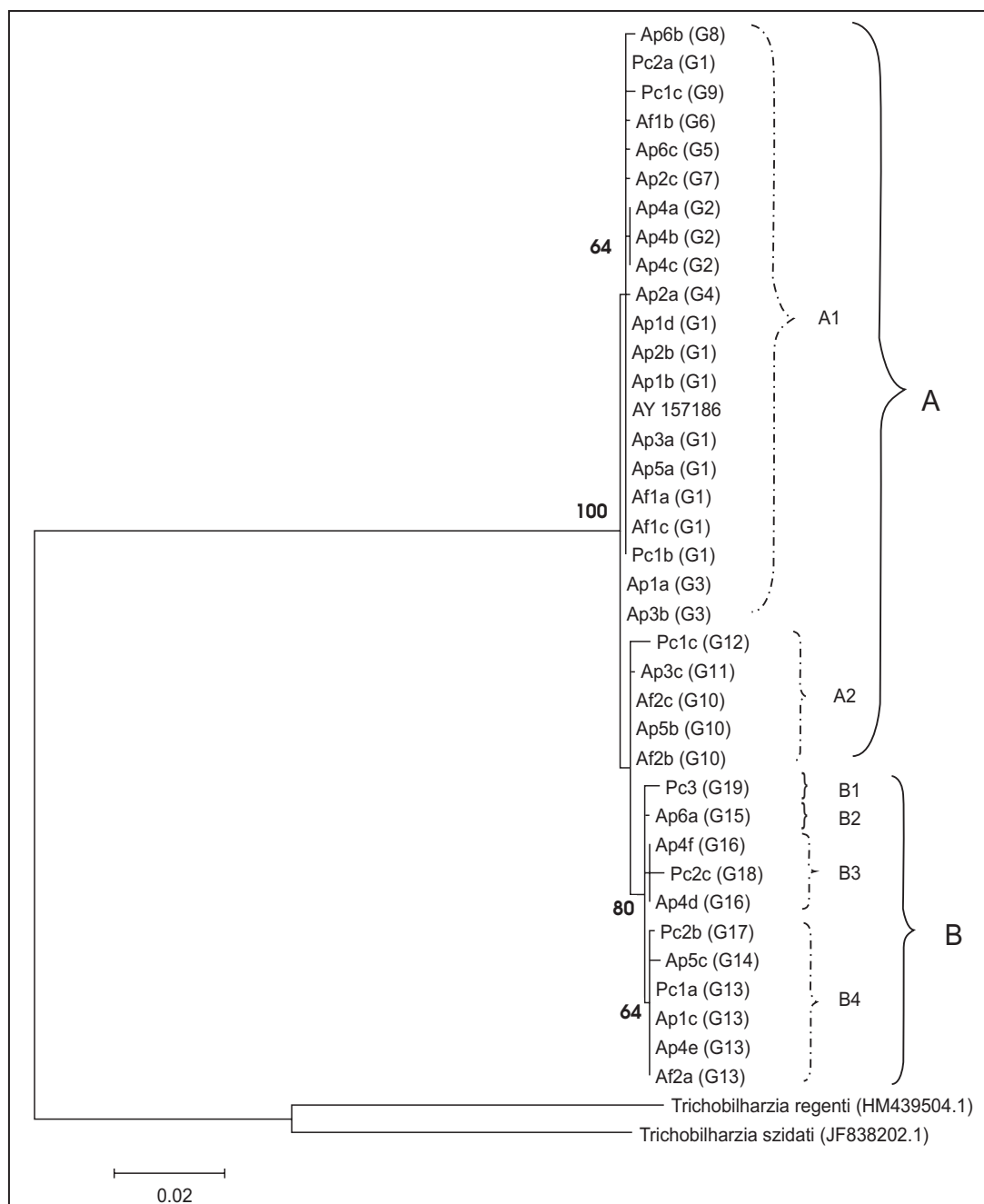


Рис. 1. Дендрограмма генетических различий между маритами *B. polonica*, построенная на основании полиморфизма нуклеотидных последовательностей гена *cox1* (ML, модель Тамуры-Неи). В узлах ветвления обозначены только ИБ > 50%. Обозначения окончательных хозяев-птиц: кряква (*Ap*), хохлатая чернеть (*Af*) и большая поганка (*Pc*).

типа *G1*, идентичного последовательности *AY157186* из Украины. Он обнаружен у 9 из 36 половозрелых шистосом, паразитирующих в птицах всех обследованных нами видов. Все остальные гаплотипы либо уникальны, либо идентичны для 2–4 марит (табл. 2). Значения генетических дистанций между последовательностями *cox1*, входящими в состав линий

А и В, варьируют от 0,001 до 0,011, составляя в среднем $0,004 \pm 0,001$. При этом отмечается низкое значение среднего уровня аминокислотной дивергенции (0,001).

Таким образом, среди обнаруженных гаплотипов можно выделить, по крайней мере, две четко дивергировавшие линии – А и В, расхождение между которыми ($d = 0,4\%$) уже

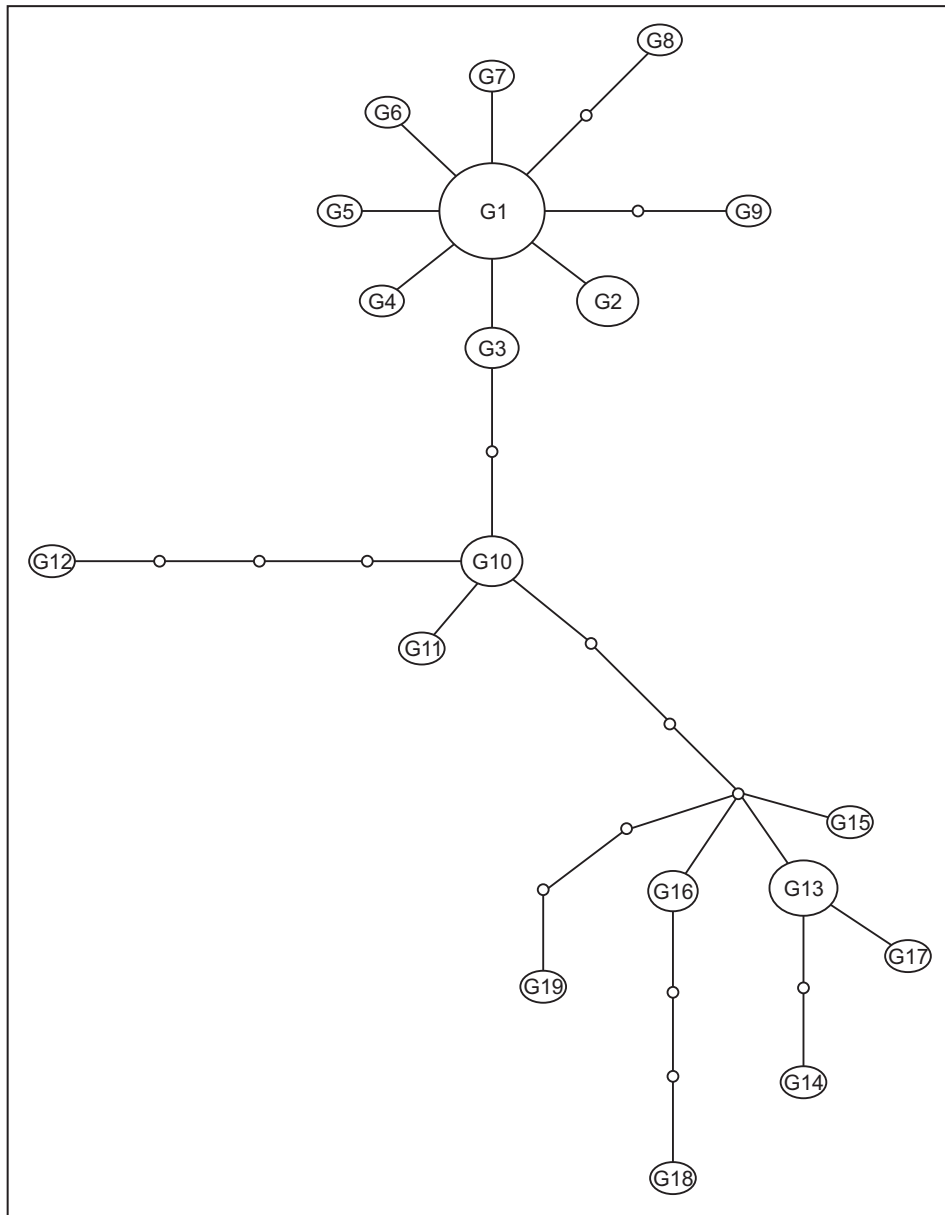


Рис. 2. Парсимониальная сеть, построенная на основании полиморфизма гена *cox1* мари́т *B.polonica* от трех видов водоплавающих птиц озера Нарочь. Размеры овалов соответствуют представленности гаплотипов в выборке

привело к незначительной аминокислотной дивергенции (0,1%). Разнообразие гаплотипов выше в линии А (12 гаплотипов), чем в линии В (7 гаплотипов). Представленность линии А среди мари́т *B. polonica* составляет 69,44%, линии В – 30,56%. Несмотря на то, что некоторые гаплотипы были получены от мари́т только из одного вида птиц и не встречались у других видов, гостальной специфичности в распределении гаплотипических линий обнаружено не было. Обе линии мари́т в различном соотношении были зарегистри-

рованы у птиц всех обследованных видов. Бильхарциеллы линии А обнаружены у всех крякв и хохлатых чернетей и у 66,7% больших поганок (у 2 из 3-х особей). Гаплотипы линии В зарегистрированы у всех больших поганок. Частота встречаемости гаплотипов данной линии у крякв составила 66,7%, а у хохлатых чернетей – 50,0%. Смешанные инвазии одной особи хозяина бильхарциеллами обеих линий отмечены у 66,7% крякв, и больших поганок, и у 50% хохлатых чернетей. Следует отметить, что «звездообразная

структура» в линии А выражена более заметно по сравнению с линией В, что свидетельствует о значительном и быстром возрастании генетического разнообразия («экспансия» А-последовательностей).

Генетическая внутривидовая дифференциация трематод *Bilharziella polonica* могла возникнуть в результате действия изоляционных механизмов. Как уже отмечалось выше, уровень дивергенции между последовательностями из двух групп достигает 0,4%. Исходя из результатов исследований в области молекулярной филогенетики, приведших к обоснованию идеи молекулярных часов [22, 23], дивергенция наиболее быстро мутирующих участков митохондриальной ДНК происходит у разных видов животных со средней скоростью 1,4–2,6% за миллион лет [24]. В таком случае время образования двух линий гаплотипов *B. polonica* предположительно составляет 285–150 тыс. лет назад, что достаточно уверенно позволяет отнести его ко времени Днепровского, или Рисского оледенения (250–135 тысяч лет назад) в позднем плейстоцене [25, 26]. В эти времена немногочисленные остатки прежней европейской фауны могли сохраниться лишь в изолированных друг от друга рефугиумах на территории Северо-Западной (или Северной) Африки, Малой Азии и Ближнего Востока, а также юге Среднерусской возвышенности. Таким образом, ледник мог сыграть роль изоляционного механизма, препятствующего генетическому обмену внутри и между популяциями водоплавающих птиц, что на какой-то период разобщило и популяции специфичных к ним паразитов – бильхарциелл. Вполне очевидно, что длительная изоляция в отдельных рефугиумах должна была отразиться и на генетическом разнообразии самих хозяев.

Попытка связать образование гаплотипических линий с внутривидовой дивергенцией окончательных хозяев была сделана нами на основе данных литературы по основному носителю шистосоматидной инвазии – крякве. Филогеографическая структура данного вида исследована довольно подробно и позволяет детализировать процессы радиации утиных птиц [27, 28]. В этом отношении особый интерес представляют исследования Куликовой с соавторами [29]. На основе анализа поли-

морфизма ядерного (шестой субъединицы орнитиндекарбоксилазы, ООС-6, 255 п.н.) и митохондриального (контрольный регион, 667 п.н.) локусов у крякв из Азии, Америки и северной части Евразии были обнаружены две группы гаплотипов мтДНК. Они соответствовали двум классам гаплотипов мтДНК, А и В, обнаруженных ранее Эвайсом с соавторами исключительно на основании ПДРФ митохондриальной ДНК. Однако выявленная внутривидовая генетическая дифференциация, произошедшая в регионе Берингии, не затронула европейскую и основную азиатскую части популяции кряквы. Вследствие этого, группировки с наличием гаплотипов обеих групп в том или ином соотношении отмечены только во внутренней Аляске, на Алеутских и других островах региона, а также в Приморье. Ввиду генетической однородности в евроазиатской части ареала популяции кряквы, у нас нет пока объективных оснований связывать наличие двух гаплотипических линий у шистосом *B. polonica* в северной части Беларуси с филогеографией данного вида водоплавающих птиц. Очевидно, что для дальнейшего анализа необходимы более многочисленные выборки инфицированных птиц из разных частей Евразии.

Вместе с тем, учитывая, что вид *B. polonica* является полигостальным и, как показали наши исследования, строгой специфичности и приуроченности к определенным видам птиц в распределении линий гаплотипов *cox 1* не существует, то теоретически любой вид дефинитивного хозяина потенциально мог иметь отношение к эволюции данного паразита. А это широкий спектр видов водоплавающих птиц, причем относящихся к разным семействам и даже отрядам. Согласно литературным данным, территорию Европы многие виды *Anatidae* населяли еще в доплейстоценовую эпоху. По крайней мере, субфоссильные остатки таких видов, как *Anser anser*, *Anas strepera*, *Anas querquedula*, *Anas clypeata*, *Aythya ferina* известны для Западной и Центральной Европы для периода, относимого к эоплейстоцену – порядка 800 тыс. лет назад [30]. Несмотря на то, что есть много свидетельств существования определенной изоляции друг от друга популяций многих видов птиц в восточном и западном секторах

европейского юга в период оледенения, практически все рецентные виды водоплавающих птиц, как более холодоустойчивые, не имели жесткой изоляции и обитали практически на всем протяжении от Атлантики до Черного и Каспийского морей. Иными словами, для *Anatidae*, являющихся основными хозяевами *B. polonica*, внутривидовая таксономическая и генетическая дифференциация в Западной Палеарктике, которая могла бы быть вызвана изолирующим действием плейстоценовых ледников, не прослеживается [31].

Таким образом, причины дифференциации паразита логичнее искать в возможных территориально-географических различиях ареалов разных видов-хозяев. То есть в период оледенений географически разделены и изолированы были не популяции кого-то одного из видов-хозяев, а ареалы разных видов утиных (или других отрядов водоплавающих), которые в настоящее время оказались опять расположены на одной территории либо более или менее перекрываются. Для облегчения поиска основного вида птиц, имеющего отношение к произошедшей генетической дифференциации паразита, важно установить географические параметры, в пределах которых это могло произойти. При этом целесообразно рассмотреть как вектор запад-восток, так и вектор север-юг, особенно в их сочетании, так как юго-западное и северо-восточное направления соответствуют основным миграционным векторам водоплавающих птиц Европы [32]. Изменение этих путей в прошлом также могло повлиять на внутривидовую дивергенцию

B. polonica. К тому же, в период оледенений именно северные криофильные виды и более теплолюбивые южные могли иметь изолированные друг от друга территории обитания. Впоследствии умеренную зону Европы постепенно заселили и те и другие виды, что и привело к образованию простирающегося на все Северное полушарие ареала вида *B. polonica*, обладающего двумя линиями гаплотипов по гену *cox1*.

Следует отметить, что эволюция паразитов могла проходить и вне условий изоляции видов хозяев, а, наоборот, благодаря концентрированию в рефугиумах птиц и моллюсков различных видов, ранее до этого не контактирующих друг с другом. Инвазия чужеродных видов и вызванные ею перестройки в сложившихся плейстоценовых экосистемах могли послужить толчком для освоения паразитами *B. polonica* или их предковыми формами новых видов дефинитивных и промежуточных хозяев. В этом случае наличие в составе современной популяции паразитов данного вида двух гаплотипических линий является следствием незаконченной сортировки предкового генного пула. Не исключено также, что гибридизация между предковыми формами *B. polonica*, специализировавшимися на паразитировании у птиц различных видов, ранее разобщенных территориально по причине различий в местах гнездования и миграционных путях, могла привести к появлению современной формы *B. polonica*, сохранившей в своем генофонде гаплотипические линии обоих предков.

Заключение

Таким образом, анализ полиморфизма митохондриального гена *cox1* выявил генетическую неоднородность внутривидовой структуры *B. polonica*, паразитирующих у водоплавающих птиц на озере Нарочь. Для корректного и обоснованного объяснения дивергенции гаплотипических линий гена *cox1* у марит *B. polonica* необходимо провести более масштабные филогеографические исследования как самих паразитов, так и их дефинитивных хозяев. Изучение различных аспектов коэволюции данных организмов имеет значение как для понимания механизмов приспособления птичьих шистосом к своим хозяевам, так и как

инструмент изучения миграционных путей водоплавающих птиц.

Авторы благодарят Т.В. Жукову за предоставление помещений и оборудования для проведения исследований в УНЦ «Нарочанская биологическая станция им. Г.Г. Винберга». Работа частично финансировалась грантами РФФИ (12-04-01153-а, 12-04-90034-Бел_а), БРФФИ № Б10Р-176, ФЦП ГК № П1043, Программой по молекулярной и клеточной биологии.

Список используемых источников

1. Brown, W.M. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA / W.M. Brown, M.Jr. George, A.C. Wilson // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. – 1979. – Vol. 76. – P. 1967–1971.
2. Moore, W.S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees / W.S. Moore // Evolution. – 1995. – Vol. 49. – P. 718–726.
3. Mindell, D.P. Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA // D.P. Mindell [et al.] // Avian molecular evolution and systematic (D.P. Mindell, editor). – New York: Academic Press, 1997. – P. 214–247.
4. Avise, J.C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematic / J.C. Avise [et al.] // Annu Rev Ecol Syst. – 1987. – Vol. 18. – P. 489–522.
5. Avise, J.C. Phylogeography: the History and Formation of Species / J.C. Avise. – Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, 2000. – P. 447.
6. Абрамсон, Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы / Н.И. Абрамсон // Вестник ВОГиС. – 2007. – Т. 11, № 2. – С. 307–331.
7. Hebert, P.D.N. Biological identifications through DNA barcodes / A. Cywinska, S.L. Ball, J.R. de Waard // Proc.R.Soc. London Ser.B. – 2003. – Vol. 270. – P. 313–321.
8. Seasonal morphological variations in bird schistosomes / C. Bayssade-Dufour [et al.] // Parasite. – 2006. – Vol. 13. – P. 205–214.
9. Dorst, J. Les migrations des oiseaux / J. Dorst // Payot. – Paris, 1956. – 419 p.
10. Stunkard, H.W. Induced gametogenesis in a Monogenetic Trematode, *Polystoma stellai* Vigueras, 1955 / H.W. Stunkard. // Journal of Parasitology. – 1959. – Vol. 45. – P. 389–394.
11. Combes, C. Correlations entre les cycles sexuels des Amphihiens Anoures et des Polystomatidae (Monogenea) / C. Combes // Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. – Paris, 1967. – Serie D, Vol. 264. – P. 1051–1052.
12. Хрисанфова, Г.Г. Полиморфизм гена *cox1* мтДНК церкариальных изолятов птичьих шистосом *Bilharziella polonica* (Класс Trematoda, сем. Schistosomatidae) из водоемов Беларуси / Г.Г. Хрисанфова, А.А. Лопаткин, А.Г. Шестак, В.А. Мищенко, Т.В. Жукова, Л.Н. Акимова, С.К. Семенова // Генетика. – 2011. – Т. 47, № 5. – С. 684–690.
13. Szidat, L. Uber Haunnfektionen bei Blutremato-den insbesondere bei Bilharziella polonica Kow. / L. Szidat // Archivfur Dermatologie und Syphilis. – 1930. – Vol. 160. – P. 304–308.
14. Cercarial dermatitis in focus: schistosomes in the Czech Republic / L. Kolarova [et al.] // Helminthologia. – 1997. – Vol. 34. – P. 127–139.
15. Беэр, С.А. Церкариозы в урбанизированных системах / С.А. Беэр, М.В. Воронин. – М.: Наука, 2007. – 240 с.
16. Бычкова, Е.И. Шистосомные церкариозы в Беларуси / Е.И. Бычкова // Ветеринарная медицина Беларуси. – № 3. – 2003. – С. 23–24.
17. Horace, P. Survival of bird schistosomes in mammalian lungs / P. Horace, L. Kolafova // International Journal for Parasitology. – 2000. – Vol. 30. – P. 65–68.
18. Zbikowska, E. Is there a potential danger of 'swimmer's itch' in Poland? / E. Zbikowska // Parasitology Research. – 2003. – Vol. 89. – P. 59–62.
19. The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistoiuma Weinland*, 1858 / A.E. Lockyer [et al.] // Parasitology. – 2003. – Vol. 26. – P. 203–224.
20. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences / S. Kumar [et al.] // Briefings in bioinformatics. – 2008. – Vol 9, № 4. – P. 299–306.
21. TCS: a computer program to estimate gene genealogies / M. Clement, D. Posada, K.A. Crandall // Molecular Ecology. – Vol. 9. – 2000. – P. 1657–1660.
22. Kimura, M., Ohta, T. Eukaryotes-prokaryotes divergence estimated by 5S ribosomal RNA sequences / M. Kimura, T. Ohta // Nat. New Biol. – 1973. – Vol. 243. – P. 199–200.
23. Хедрик, Ф. Генетика популяций. – М.: Техносфера, 2003. – 592 с.
24. Hewitt, G.M. Post-glacial re-colonization of European biota / G.M. Hewitt // Biological Journal of the Linnean Society. – 1999. – Vol. 68. – P. 87–112.
25. Гричук, В.П. История флоры и растительности Русской равнины в плейстоцене. – М.: Наука, 1989. – 183 с.

26. Четвертичная система. – М.: Недра, 1984. – Т. 2. – 556 с.
27. Avise, J.C. Mitochondrial gene trees and the evolutionary relationship between mallard and black ducks / J.C. Avise, C.D. Ankney, W.S. Nelson // *Evolution*. – 1990. – Vol. 44. – P. 1109–1119.
28. Jonson, K.P., Sorenson, M.D. Phylogeny and biogeography of dabbling ducks (genus: *Anas*): a comparison of molecular and morphological evidence // *Auk*. – 1999. – Vol. 116. – P. 792–805.
29. Kulikova, I.V. Phylogeography of the Mallard (*Anas platyrhynchos*): hybridization, dispersal, and lineage sorting contribute to complex geographic structure / I.V. Kulikova [et al.] // *The Auk*. – 2005. – Vol. 122, Issue 3. – P. 949–965.
30. Lambrecht, K. Handbuch der Palaeornithologie. – Berlin.: Borntraeger, 1933. – 1024 p.
31. Никифоров, М.Е. Формирование и структура орнитофауны Беларуси / М.Е. Никифоров. – Минск: «Белорусская наука», 2008. – 297 с.
32. The Epidemiology of Plant Diseases (B.M. Cooke, D.G. Jones, B. Kaye, etc.) / ed. M.R. Finckh, M.S. Wolfe // Chapter 10. Diversification Strategies. – Springer. The Netherlands. – 2006. – P. 269–307.

Дата поступления статьи 26 сентября 2012 г.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В СЕЛЕКЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ (обзорная статья)

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

Введение

Для предотвращения «генетической эрозии» сельскохозяйственных растений в результате катастрофического сужения их генетического разнообразия предложены диверсификационные стратегии селекции современных сортов на болезнестойчивость. К этому привело понимание взаимодействий между растением-хозяином и популяциями патогенов.

Диверсификационные стратегии предполагают переход от монокультуры к разнообразию, что обеспечивает более устойчивые формы земледелия и дает ряд преимуществ по сравнению с монокультурой. На первичном уровне следует диверсифицировать гены устойчивости в монокультуре, на более сложном – создавать системы, которые способны обеспечить многие экологические преимущества одновременно,

например, контроль эрозии, сорняков, вредителей и болезней при сохранении или повышении масштаба и эффективности производства [1].

Стратегии диверсификации необходимо рассматривать с точки зрения управления целым рядом абиотических и биотических проблем, стоящих перед производством продукции в определенной местности. Однако в настоящее время в основном используется стратегия диверсификации только на первичном уровне. Она предполагает расширение генетического разнообразия сортов сельскохозяйственной культуры по факторам устойчивости обычно к одному патогену. В настоящей статье будет рассмотрена диверсификационная стратегия селекции мягкой пшеницы, основанная на генетическом разнообразии сортов по генам устойчивости к бурой ржавчине.

Биологические особенности возбудителя бурой ржавчины пшеницы и вредоносность

Возбудитель листовой (бурой) ржавчины пшеницы – биотрофный грибной патоген *Puccinia triticina* Erikss. (синоним – *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Dietel & Holw). Симптомы поражения проявляются в основном на листовой пластинке и влагалищах в виде беспорядочно разбросанных урединиопустул бурого цвета, которые содержат урединиоспоры. Размножение преимущественно вегетативное урединиоспорами, которые переносятся ветром и дождем на зеленые участки листьев и способны распространяться ветром на большие расстояния [2]. Споры могут передвигаться на высоте до 3000 м в виде облака, преодолевая большие расстояния. В течение вегетационного периода выращивания пшеницы в условиях умеренного климата формируется до 10 урединиальных поколений гриба. Подсчитано, что при поражении одного про-

цента листовой поверхности бурой ржавчиной число сформировавшихся урединиоспор на 1 га посевов в сутки составляет 10^{11} , что может приводить к ежедневному появлению 100 тыс. мутантов или 1000 мутаций на локус. Патоген перезимовывает даже в суровые зимы в виде урединиоспор в урединиях на отмерших листьях [3], а также телиоспор на стерне. В некоторых районах он зимует в виде уредомицелия в узлах кушения озимой пшеницы. Таким образом, жизненная стратегия этого патогена базируется на быстром инфекционном цикле, большой споруляционной способности и высокой эффективности инфекции.

Бурая ржавчина является одним из вредоносных и распространенных заболеваний мягкой пшеницы в мире и в условиях Беларуси. Эта болезнь при сильном поражении посевов может снижать урожай зерна до 70% [4].

Регулярное поражение пшеницы бурой ржавчиной приводит к более высоким потерям зерна, чем от стеблевой и желтой ржавчины [5]. На пораженных растениях развиваются мелкие зерновки, в колосе снижается завязываемость семян, особенно в колосках у верхушки и основания колосьев [6]. Резко

ухудшается и качество продукции, полученной с пораженных растений [5]. Выход муки из зерна уменьшается на 40%, в клейковине содержится меньше белков [7], обедняется аминокислотный состав [8], снижается натура и стекловидность зерна, показатели седиментации и силы муки [9].

Научная основа стратегии селекции

Стратегия селекции мягкой пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине предполагает использование главных генов устойчивости и малых генов. Основное распространение получила стратегия использования известных эффективных главных генов и их комбинаций (пирамид). Пирамидирование («укладка генов») может применяться и при использовании преодоленных главных генов. В этом случае приемлемый уровень устойчивости достигается за счет остаточных эффектов на устойчивость, проявляемых каждым преодоленным геном и их аддитивного действия. Затраты на пирамидирование качественных генов устойчивости к болезням низкие [10]. Аккумуляция в сорте многих малых генов устойчивости (полигенов), обуславливающих количественную неспецифическую устойчивость, применяется реже. Создание сортов с такой устойчивостью – более сложный и длительный процесс. Однако если вертикальная устойчивость сорта, основанная на использовании главных генов, сочетается с горизонтальной (нерасоспецифической) устойчивостью, то появление новой вирулентной расы патогена вряд ли будет иметь катастрофические последствия в случае преодоления генов вертикальной устойчивости. Кроме того, имеются наблюдения и о более продолжительной эффективности главных генов, если они введены в сорт с неспецифической устойчивостью.

Для использования главных генов устойчивости в селекции, прежде всего, важно знать их эффективность к популяциям патогенов, распространенных на той территории, где будут возделываться создаваемые сорта. В связи с этим большое значение приобретает мониторинг генов вирулентности, который должен проводиться для возбудителя бурой ржавчины пшеницы не реже 1 раза в 3–4 года. Наблюдения за вирулентностью популяций позволяют предсказывать уязвимость сорта к мутацион-

ному изменению патогена. Своевременное выявление патотипов с вирулентностью к используемым генам устойчивости является основой для уменьшения площади посева под сортами, несущими такие гены, и дает возможность быстро рекомендовать использование фунгицидов.

Признание мутации, как главного источника вариабельности возбудителя бурой ржавчины, привело к развитию упреждающей селекции [11]. Она основана на мониторинге вирулентности популяции патогена, который позволяет предсказать эффективность генов устойчивости во времени, обеспечивая при этом необходимой информацией селекционеров. В связи с этим гены устойчивости, применяемые в коммерческих сортах, должны быть представлены в наборе дифференциаторов, используемых для определения патотипов возбудителя болезни.

Установление путей миграции патогена с целью определения ареалов сходных по вирулентности популяций также имеет большое значение. Так, на территории бывшего СССР ранее было выделено пять изолированных популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы: 1) европейская (Северный Кавказ, Украина, Центрально-Черноземная зона); 2) закавказская; 3) западно-сибирская (Урал, Западная Сибирь, Казахстан); 4) среднеазиатская (горные районы средней Азии) и 5) дальневосточная (Хабаровский, Приморский край) [12]. Однако в дальнейшем по данным 20-летнего исследования Михайловой Л.А. были выделены ареалы трех изолированных популяций *Puccinia triticina* Erikss.: европейской, закавказской, азиатской (Зауралье, Северный Казахстан, Западная Сибирь) [13]. Проведенное недавно исследование изолятов *Puccinia triticina* Erikss. по фенотипам вирулентности и RAPD подтвердило, что изоляты из Северного Кавказа и Ленинградской области принадлежат к

обширной европейской популяции [14]. Территория Республики Беларусь также входит в ареал европейской популяции гриба.

В связи с таким обширным ареалом распространения возбудителя необходимо создание генетически разнородных сортов пшеницы, которые в случае появления соответствующих генов вирулентности в популяции гриба, не будут поражены одновременно. При этом важнейшее значение для селекции имеет политика территориального размещения генов устойчивости. Российскими учеными она уже разработана. Так, с учетом заноса инфекции из южных районов России в северном и восточном направлениях, селекцию в этих зонах предложено вести с использованием различных генов [15]. Поволжский район занимает промежуточное положение на пути распространения ржавчины в Западную Сибирь и Северный Казахстан. Генетическая основа сортов

в этом районе должна отличаться от сортов Европейской и Азиатской частей России, а также Северного Казахстана [16]. Однако, как указывает Сурин Н.А., Поволжье и Башкирия до сих пор продолжают оставаться ржавчинным коридором, и отсутствует сортовой контроль бурой ржавчины в основных очагах ее развития - на Северном Кавказе и Украине [17].

Кроме больших пространственных мозаик сортов с разными генами, возможно также создание мозаик генов во времени на территории одного района. При этом озимым и яровым сортам придают разную устойчивость. При такой мозаике возникающая инфекция на озимых сортах не передается весной на яровые, защищенные другими генами. А осенью, напротив, после уборки яровых, в случае развития на них вирулентных клонов, эти изоляты не попадают на всходы озимых сортов, содержащих иные гены устойчивости.

Гены устойчивости и их эффективность

Эффективных к современной популяции *Puccinia triticina* Erikss. генов устойчивости немного. Сортообразцы мягкой пшеницы, представленные в мировой коллекции ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, из эффективных проростковых генов устойчивости содержат только *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr41* (= *Lr39*) [18]. По данным Гулятьевой с сотрудниками, среди районированных в России 100 озимых и 131 яровых сортов пшеницы обнаружено низкое генетическое разнообразие по эффективным *Lr*-генам: подавляющее большинство устойчивых сортов имеют *Lr9* и *Lr19* [19]. Однако не было выявлено российских сортов с высокоэффективными возрастным геном *Lr37* и проростковыми генами *Lr21*, *Lr25*, *Lr29*, *Lr39*, что показывает их значимость для дальнейшего использования в селекции [19]. Также ген *Lr37* идентифицирован как наиболее эффективный из генов устойчивости, используемых в настоящее время в европейских сортах пшеницы, хотя к нему и наблюдается некоторая частота вирулентных изолятов в зависимости от местонахождения популяции гриба [20]. Проведенный мониторинг вирулентности белорусской популяции гриба показал неэффективность генов *Lr25*, *Lr29*, *Lr39* [21], а в северо-западной российской популяции - гена *Lr37* [22].

В ряде регионов России, в частности на Северном Кавказе, эффективны гены устойчивости *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr29*, *Lr42*, а к генам *Lr52* (*LrW*) и *Lr45* наблюдается низкая частота встречаемости вирулентных изолятов (около 2–3%) [23]. Тем не менее, к северо-западной российской популяции ген *Lr52* не эффективен [22]. По последним данным изучения вирулентности популяции гриба на Северном Кавказе для селекции в этом регионе предложены гены *Lr9* и *Lr24* [24]. В Нечерноземной зоне России эффективны проростковые гены *Lr9*, *Lr24*, *Lr27* + *Lr31*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr45*, *Lr50*, *Lr51* и возрастные *Lr22a*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr46* [25].

Высокоэффективным во всем мире является ген *Lr9*. Он включен в селекционные программы многих стран, несмотря на то, что присутствие чужеродной транслокации с этим геном снижает урожайность [26, 27]. До 2007 года ген был эффективен во всех регионах России [28]. Широкое его использование началось в Западной Сибири в 2008 г. [29]. Сейчас районированные сорта с этим геном возделываются в ряде экономических районов России (Северо-Западном, Центральном, Волго-Вятском, Уральском) и Западной Сибири. Однородность сортов по устойчивости на такой большой территории недопустима, так как создает угрозу для производства пшеницы

в будущем. Уже показано, что ген *Lr9* начал терять свою эффективность в Западной Сибири, на Урале и в США [18, 30, 31]. Анализ структуры белорусской популяции патогена показал, что в период с 1980 по 2009 гг. частота встречаемости изолятов с вирулентностью к гену *Lr9* не превышала 3% [32].

Ген *Lr19* в России и странах СНГ сохранял свою эффективность более 40 лет [28]. В связи с этим сорта с геном *Lr19* получили массовое распространение в Поволжье, начиная с конца 1990 – начала 2000 гг. [29]. Сейчас они районированы преимущественно в Поволжских, Уральских районах России, Западной и Восточной Сибири [19, 29]. В связи с широким возделыванием сортов с геном *Lr19* на этой территории, он утратил свою эффективность. Кроме того, изоляты с вирулентностью к *Lr19* ежегодно выявляются в Центрально-Черноземном, Центральном, Северо-Западном регионах, что подтверждает недопустимость возделывания генетически однородных сортов. В Беларуси также встречаются изоляты с вирулентностью к этому гену с частотой не более 3% [32]. Однако показано, что комбинация гена *Lr19* с утратившим эффективность геном *Lr26* обеспечивает устойчивость [33]. Присутствие гена *Lr19* повышает урожайность [34].

Изоляты с вирулентностью к гену *Lr24* встречаются в популяциях, распространенных в Северо-Западном [14], Центральном и Центрально – Черноземном регионах [25], Западной Сибири [29, 31]. В российских сортах ген *Lr24* не выявлен, поэтому считается, что наличие к нему вирулентных изолятов может быть вызвано миграцией из европейских стран [29], где они были обнаружены более 30 лет назад [20]. В Республике Беларусь частота встречаемости генотипов гриба с геном вирулентности к *Lr24* за последние 30 лет увеличилась с до 2,4% (1980 г.) до 51% (2009 г.) [32].

По данным Коваленко с соавторами, в разных регионах России эффективны проростковые гены *Lr24*, *Lr29*, *Lr38*, *Lr39*, *Lr42*, *Lr45*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr52(LrW)*, *Lr53*, *LrTr* и возрастной ген *Lr22a* [28]. Ко всем патотипам во всех регионах возделывания пшеницы в России эффективны проростковые гены *Lr24*, *Lr29*, *Lr38*, *Lr39*, *Lr42*, *Lr45*, *Lr47* и возрастные *Lr12*, *Lr13*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr22a* [35]. Однако в Западной Сибири уже были выявлены вирулентные к *Lr38*

изоляты на сорте Черныява в 2010 г. [36]. Некоторые из этих генов могут быть сцеплены с нежелательными признаками или оказывать плейотропный эффект на хозяйственно ценные свойства. Так, например, ген *Lr38* снижает урожай зерна [37, 38], ген *Lr47* ухудшает качественные и агрономические признаки [39]. В то же время многие интрогрессивные гены устойчивости успешно использованы в селекции [40].

Лапочкиной с соавторами создана коллекция пшеницы «Арсенал», которая включает более 200 генотипов пшеницы с генетическим материалом *Aegilops speltoides*, *Ae. triuncialis*, *Triticum kiharae*, *Secale cereale* [41]. В интрогрессивных линиях выявлены комбинации генов, которые гарантируют полевую устойчивость к бурой ржавчине (*Lr1+Lr10+Lr21*; *Lr10+Lr21+Lr35*; *Lr21+Lr12+Lr34*) [42]. Комбинация проростковых генов *Lr27+Lr31* и возрастных *Lr12*, *Lr34*, *Lr35* обуславливает иммунитет и долговременную устойчивость. Были отобраны также образцы с уникальными комбинациями 5–6 генов устойчивости: *Lr1*, *Lr9*, *Lr21*, *Lr12*, *Lr37* и *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr21*, *Lr24*, *Lr37*; *Lr24*, *Lr26+++*. Такой материал может быть использован для пирамидирования генов в элитных сортах. Предлагается комбинирование проростковых генов с возрастными генами и хорошо изученным геном медленного развития ржавчины *Lr46*. Особую ценность представляют полученные растения с комбинацией генов *Lr9+Lr46+Lr37* [41]. Сочетание 2–3 генов расоспецифической и возрастной устойчивости позволяет увеличить длительность устойчивости. Так, в России высоким уровнем частичной устойчивости характеризуются образцы с генами *Lr46*, *Lr44*, *Lr27+Lr31*, *Lr25+Lr28*, *Lr10+Lr20*, *Lr26+Lr46*, *Lr9+Lr46*, *Lr13+Lr34*, *Lr12+Lr37* и др. [28]. Однако на территории Центрального, Волго-Вятского, Западно-Сибирского регионов комбинация генов *Lr27+Lr31* и ген *Lr39* неэффективны, они восприимчивы к более чем 50% изолятов возбудителя бурой ржавчины [43].

В условиях Беларуси из исследованных проростковых генов более эффективны, как уже отмечалось ранее, гены *Lr9* и *Lr19* [32]. Однако при создании новых сортов пшеницы необходимо использовать другие эффективные гены, пока редко применяемые в сортах,

выращиваемых на европейской территории, в частности, новые интрогрессивные гены, которые рекомендованы российскими учеными для защиты сортов пшеницы от европейской популяции гриба.

Наряду с проростковыми генами, экспрессирующимися на протяжении всего онтогенеза растений, перспективно использование генов возрастной устойчивости (APR – adult plant resistance). Гены APR вызывают повышенный интерес, так как они контролируют частичную, неполную устойчивость, которая обычно проявляется на флаговом и подфлаговом листьях в виде медленного развития болезни. Медленное развитие ржавчины (сдерживание скорости развития болезни) является результатом более длинного латентного периода, меньшего размера пустул и их более слабого спороношения. В поле этот тип устойчивости может быть оценен как снижение площади под кривой нарастания болезни или более низкой конечной степенью поражения в сравнении с восприимчивым контролем [45–47]. Селекция на медленное развитие ржавчины на взрослых растениях и применение сортов, которые имеют достаточные уровни такой устойчивости, является лучшей стратегией на устойчивость к ржавчине [47]. Медленное развитие ржавчины – не обязательно стабильный признак и не является диагностическим для длительной устойчивости. Однако некоторые сорта с медленным развитием ржавчины обладают длительной устойчивостью, и они представляют наиболее ценный материал для анализа генетической природы длительности и селекции [48]. Так, например, в стратегии, где используется APR, чтобы разработать длительно устойчивые сорта, ценным генетическим ресурсом для селекции является ген *Lr67* [49]. На сортах с медленным развитием ржавчины может наблюдаться расоспецифичность, в этих случаях устойчивость не будет длительной. Генами APR к бурой ржавчине являются *Lr12*, *Lr13*, *Lr22a*, *Lr22b*, *Lr34*, *Lr46*, *Lr48*, *Lr49*, *Lr67*, *Lr68* и др. [50, 51]. Такие гены используют в селекции путем введения в местные адаптированные сорта.

Для достижения большего эффекта в одном сорте необходимо сочетать несколько генов, контролирующих медленное развитие ржавчины, так как обычно использования одного

гена недостаточно, чтобы существенно ограничить развитие болезни. В некоторых случаях гены этого типа устойчивости обуславливают высокий уровень устойчивости при их комбинировании в одном генотипе, и иногда это было описано почти как иммунитет [52, 53]. Желательно, чтобы гены медленного развития ржавчины обуславливали длительную устойчивость. Так, сорта селекции CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo – Maize and Wheat Improvement Center, Центр по улучшению кукурузы и пшеницы) с возрастными генами *Lr13* и *Lr34*, дополненные 2–3 генами с аддитивным эффектом, сохраняли устойчивость к бурой ржавчине в некоторых странах более 30 лет [54]. Известно, что приобретение патотипом возбудителя болезни мутаций вирулентности к нескольким генам устойчивости происходит не быстро [55]. В образцах яровой пшеницы селекции CIMMYT из присутствующих 10–12 генов медленного развития бурой ржавчины хорошо охарактеризованы только два: *Lr34* и *Lr46* [56]. Ген *Lr34* является одним из важных компонентов медленной или частичной устойчивости к бурой ржавчине пшеницы. Он был назван «истинным геном частичной устойчивости» [57]. Ген медленного развития бурой ржавчины *Lr34* был клонирован [58], что дало возможность лучше понять его генетическую природу и разработать ДНК-маркеры [59]. Они позволяют использовать *Lr34* в селекции на длительную устойчивость в присутствии главных проростковых генов, а также в условиях окружающей среды, неблагоприятных для отбора по этому признаку. Этот ген весьма эффективен, если в одном генотипе пирамидируют 4 или более малых генов, что было показано в CIMMYT. Около 55% европейских сортов пшеницы имели возрастную устойчивость, обусловленную количественными генами (QTLs) и (или) *Lr34* [60].

Однако в разных странах могут наблюдаться различия в поражаемости одних и тех же генотипов пшеницы, что обусловлено не идентичностью популяций патогена, а также различной экспрессией генов устойчивости в разных окружающих условиях. Известно, например, что ген *Lr34* лучше экспрессируется при более низких температурах [61]. По данным Плотниковой и Штубей, на юге Западной

Сибири ген *Lr34* был мало эффективен при температуре выше 20 °С, но снижал скорость развития болезни при среднесуточной температуре ниже 16 °С [62]. К северо-западной популяции возбудителя бурой ржавчины России ген *Lr34* не обеспечивает достаточного уровня устойчивости [22], но при его сочетании с возрастным, также индивидуально неэффективным геном *Lr13*, достигается хорошая защита, которая наблюдается у сортов Chris и Сосогаке 75, несущих комбинацию двух этих генов [22]. Исследование сорта озимой пшеницы Безостая 1, который длительное время сохранял устойчивость к бурой ржавчине, показало, что он имеет комплекс проростковых и возрастных генов: *Lr3a*, *Lr10*, *Lr34* [63]; *Lr25*, *Lr28*, *Lr47* [65].

В настоящее время хорошо охарактеризованными генами медленного развития бурой ржавчины являются *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* [65]. Плейотропное действие этих генов на другие болезни увеличивает их значимость для селекции на устойчивость ко многим патогенам [66, 67]. Неспецифическая устойчивость, контролируемая этими генами, не связана с реакцией сверхчувствительности и проявляется до внедрения гаусториев в клетки растения [49, 62,

68–70]. Возрастной ген сверхчувствительности *Lr48* является рецессивным и обуславливает устойчивость ко всем местным патотипам возбудителя бурой ржавчины в Индии [50].

Сейчас для основных районов возделывания озимой пшеницы в России (Северного Кавказа, Центрального и Центрально-Черноземного регионов) предлагается создавать сорта с возрастной устойчивостью, в том числе устойчивостью с медленным развитием болезни [35]. Это будет способствовать снижению уровня инфекции и уменьшению ее миграции на яровую пшеницу в Поволжье. В Поволжском регионе выращивается озимая и яровая пшеница, поэтому сорта разных типов развития предлагается защищать различающимися генами устойчивости. В Поволжье наиболее часто наблюдаются эпифитотии бурой ржавчины (6 раз за период 2001–2008 гг.), поэтому и в данный регион рекомендуется вводить сорта с генами возрастной устойчивости [35, 71]. В Западной и Восточной Сибири, где превалирует яровая пшеница, сорта можно защищать разными эффективными проростковыми генами. В Беларуси наиболее перспективно создавать сорта с сочетанием возрастной и проростковой устойчивости.

Заключение

Использование известных главных генов устойчивости, как возрастных, так и проростковых, к которым разработаны молекулярные маркеры, облегчает их комбинирование в одном сорте и представляет собой идеальную генетическую устойчивость, которая снижает вероятность того, что весь комплекс генов устойчивости, имеющийся у сорта, будет быстро преодолен независимыми мутациями патогена. В связи с непрерывным расообра-

зовательным процессом в популяции патогена необходим мониторинг генов вирулентности. Скорость накопления новых вирулентных изолятов к возделываемым сортам зависит от занимаемой ими площади, поэтому для предотвращения быстрой потери устойчивости, должно поддерживаться генетическое разнообразие возделываемых сортов пшеницы, и площадь посева под каждым из них не должна превышать 9–10% [12].

Список используемых источников

1. The Epidemiology of Plant Diseases (B.M. Cooke, D.G. Jones, B. Kaye, etc.) / ed. M.R. Finckh, M.S. Wolfe // Chapter 10. Diversification Strategies. – Springer. The Netherlands. – 2006. – P. 269–307.
2. McDonald, B.A. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance / B.A. McDonald, C. Linde // Ann. Rev. Phytopathol. – 2002. – Vol. 40. – P. 349–379.
3. Winter and early spring survival of *Puccinia recondita* on Kansas wheat during 1980–1986 / M.G. Eversmeyer [et al.] // Plant Disease. – 1988. – Vol. 72. – P. 1074–1076.
4. Дмитриев, А.П. Исследование внутривидовых популяционных процессов у *Puccinia recondita* Rob. ex Desmf. sp. *tritici* Erikss. и генофонда устойчивости пшениц Закавказья к бурой ржавчине: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / А.П. Дмитриев; ВНИИР. – Л., 1975. – 26 с.

5. Воронкова, А.А. Генетико-иммунологические основы селекции пшеницы на устойчивость к ржавчине. – М.: Колос, 1980. – 191 с.
6. Mains, E.B. Effect of leaf rust (*Puccinia triticina* Erikss.) on yield of wheat / E.B. Mains // J. Agr. Res. – 1930. – Vol. 40, № 5. – P. 417–446.
7. Степанов, К.М. Ржавчина зерновых культур / К.М. Степанов. – Л.: Колос, 1975. – 75 с.
8. Берлянд-Кожевников, В.М. Селекция пшеницы на устойчивость к основным грибным заболеваниям / В.М. Берлянд-Кожевников, М.А. Федин. – М.: ВНИИТЭИСХ, ВАСХНИЛ, 1977. – 57 с.
9. Мочалова, Л. Вредоносность бурой ржавчины пшеницы / Л. Мочалова // Сборник научных трудов Мироновского НИИСХ. – 1978. – Вып. 2. – С. 136–141.
10. The powdery mildews. A comprehensive treatise (Bélanger R.R., Bushnell W.R., Dik A.J., Carver T.L.W., etc.) / J.K.M. Brown // Comparative Genetics of Avirulence and Fungicide Resistance in the Powdery Mildew Fungi. APS Press, St. Paul, M.N. – 2002. – P. 36–65.
11. Using race survey outputs to protect wheat from rust / R.F. Park [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 25–32.
12. Использование эффективных Lr-генов в селекции пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине: методические рекомендации / Г.К. Сорокина [и др.]; ВАСХНИЛ. – М., 1990. – 32 с.
13. Mikhailova, L.A The *Puccinia recondita* f.sp.*tritici* populations in Russia and neighbouring countries // L.A. Mikhailova // Abstracts Adaptation in Plant Breeding XIV EUCARPIA Congress. – Juvaskyla, Finland. – 1995. – P. 47.
14. Вирулентность и ДНК-полиморфизм изолятов *Puccinia triticina* из Северного Кавказа и Ленинградской области / О.А. Кудинова [и др.] // Научный журнал КубГАУ. – 2010. – № 62 (08). – С. 1–13.
15. Михайлова, Л.А. Закономерности изменчивости популяций возбудителя бурой ржавчины и генетический контроль устойчивости пшеницы к болезни: автореф. дис. ... доктора биол. наук: 06.01.11 / Л.А. Михайлова; РАСХН, ВНИИЗР. – СПб, 1996. – 63 с.
16. Одинцова, И.Г. Пути селекции на устойчивость в связи с миграцией возбудителя бурой ржавчины пшеницы / И.Г. Одинцова, Л.Ф. Шеломова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1977. – Т. 58, вып. 3. – С. 41–44.
17. Сурин, Н.А. Адаптивный потенциал сортов зерновых культур сибирской селекции и пути его совершенствования (пшеница, ячмень, овес) / Н.А. Сурин // Селекция на иммунитет к грибным заболеваниям. – Новосибирск, 2011. – С. 90–120.
18. Тырышкин, Л.Г. К вопросу о возможности использования ДНК-маркеров для постуляции генов устойчивости пшеницы к листовой ржавчине // Л.Г. Тырышкин // Проблемы защиты растений в условиях современного сельскохозяйственного производства / Всерос. науч.-исслед. ин-т защиты растений, СПб. – 2009. – С. 152–155.
19. Молекулярные подходы в идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у российских сортов пшеницы / Е.И. Гультьева [и др.] // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2009. – № 5. – С. 23–26.
20. European virulence survey for leaf rust in wheat / A. Mesterhazy [et al.] // Agronomie. – 2000. – № 20. – P. 793–804.
21. Частота генов вирулентности в белорусских популяциях *Puccinia triticina* Erikss. / А.А. Булойчик [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. трудов. – Минск, 2010. – Т. 11. – С. 69–74.
22. Курбанова, П.М. Генетическое разнообразие яровой мягкой пшеницы по эффективной возрастной устойчивости к листовой ржавчине: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07 / П.М. Курбанова; ВНИИР. – СПб, 2011. – 20 с.
23. Population structure of wheat disease pathogens causing epiphytotics in Southern Russia / G. Volkova // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 230.
24. Кудинова, О.А. Взаимосвязь вирулентности RAPD-полиморфизма северокавказской популяции возбудителя бурой ржавчины пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.07 / Кудинова О.А.; ГНУ ВНИИБЗР РАСХН. – Краснодар, 2012. – 24 с.

25. Доноры устойчивости яровой мягкой пшеницы к бурой ржавчине и мучнистой росе с генетическим материалом видов *Aegilops speltoides* L., *Ae. Triuncialis* L., *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. / С.В. Дженин [и др.] // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2009. – № 5. – С. 3–7.
26. Leaf rust resistance gene *Lr9* and winter wheat yield reduction: I. Yield and yield components / S. Orтели // Crop Science. – 1996. – Vol. 36. – P. 1590–1595.
27. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status / В. Friebe // Euphytica. – 1996. – Vol. 91. – P. 59–87.
28. Коваленко, Е.Д. Современное состояние популяций возбудителя бурой ржавчины и создание генбанка источников и доноров устойчивости пшеницы / Е.Д. Коваленко [и др.] // Иммунологическая защита сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей: материалы Междунар. науч. – практ. конф., посвящ. 125-летию со дня рожд. Н.И. Вавилова, Большие Вяземы Московской области 17–21 июля 2012 г. – Большие Вяземы, 2012. – С. 69–80.
29. Гульятеева, Е.И. Генетическое разнообразие российских сортов мягкой пшеницы по устойчивости к возбудителю бурой ржавчины // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2012. – № 2. – С. 29–32.
30. Мешкова, Л.В. Тенденция увеличения вирулентности возбудителя бурой ржавчины пшеницы к эффективным генам устойчивости в Омской области / Л.В. Мешкова, Л.П. Россеева // Современные средства, методы и технологии защиты растений: материалы Междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2008. – С. 149–153.
31. Сочалова, Л.П. Изучение устойчивости пшеницы к листовым патогенам в условиях Западной Сибири / Л.П. Сочалова, Е.И. Лихенко // Растениеводство и селекция. – 2011. – № 1. – С. 18–25.
32. Частота встречаемости генов вирулентности в белорусских популяциях *Puccinia triticina* / А.А. Булойчик [и др.] // Микология и фитопатология. – 2011. – Т. 45, № 5. – С. 436–442.
33. Зубов, Д.Е. Селекционная ценность доноров устойчивости яровой мягкой пшеницы к листовой ржавчине в Среднем Поволжье: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.05 / Д.Е. Зубов; ФГОУ ВПО «Самарская государственная сельскохозяйственная академия». – Кинель, 2011. – 19 с.
34. Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7Ag and 1BL.1RS in spring wheat / R.P. Singh [et al.] // Crop Science. – 1998. – Vol. 38. – P. 27–33.
35. Методы оценки и отбора исходного материала при создании сортов пшеницы устойчивых к бурой ржавчине: методические рекомендации / Е.Д. Коваленко [и др.]; РАСХН, ВНИИФ. – Москва. – 2012. – 93 с.
36. Оценка и характеристика образцов коллекции синтетической пшеницы ($2n=42$) как новых источников устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе в условиях Нечерноземной зоны РФ / И.Ф. Лапочкина [и др.] // Известия ТСХА. – Вып. 6. – 2011. – С. 39–48.
37. Dyck, L. Evaluation of leaf rust resistance from wheat chromosomal translocation lines / L. Dyck, В. Friebe // Crop Science. – 1993. – Vol. 33. – P. 687–690.
38. Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers / S.A. Mebrate // Euphytica. – 2008. – Vol. 162, № 3. – P. 457–466.
39. Agronomic and quality evaluation of common wheat near-isogenic lines carrying the leaf rust resistance gene *Lr47* / С. Brevis [et al.] // Crop Science. – 2008. – Vol. 48. – P. 1441–1451.
40. Влияние отдельных участков хромосом *Triticum timopheevii* на формирование устойчивости к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы // Е.М. Тимонова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 142–159.
41. Лапочкина, И.Ф. Разнообразие коллекции мягкой пшеницы «Арсенал» и его использование в селекционно-генетических исследованиях / И.Ф. Лапочкина // Иммунологическая защита сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию со дня рожд. Н.И. Вавилова, Большие Вяземы Московской обл. 17-21 июля 2012 г. – Большие Вяземы, 2012. – С. 401–408.

42. Lapochkina, I.F. Diversity of genes of resistance to leaf rust in "Arsenal" wheat collection / I.F. Lapochkina // 8th International Wheat Conference: Abstracts of oral and poster presentations, St. Peterburg, Russian 1–4 June 2010. – St. Peterburg, 2010. – P. 280–281.
43. Эффективность ювенильных генов устойчивости в 2009-2010 годах против бурой ржавчины пшеницы на территории РФ / А.И. Жемчужина [и др.] // Иммунологическая защита сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 125-летию со дня рожд. Н.И. Вавилова (17–21 июля 2012 г. Большие Вяземы Московской обл.). – Большие Вяземы. – 2012. – С. 376–379.
44. Ohm, H.W. Three components of slow leaf-rusting at different growth stages in wheat / H.W. Ohm, G.E. Shaner // *Phytopathology*. – 1976. – Vol. 66. – P. 1356–1360.
45. Wilcoxson, R.D. Genetics of slow rusting in cereals / R.D. Wilcoxson // *Phytopathology*. – 1981. – Vol. 71. – P. 898–992.
46. Associations and genetics of three components of slow rusting in leaf rust of wheat / M.K. Das [et al.] // *Euphytica*. – 1993. – Vol. 68. – P. 99–109.
47. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina* / J. Huerta-Espino [et al.] // *Euphytica*. – 2011. – Vol. 179. – P. 143–160.
48. Johnson, R. A critical analysis of durable resistance / R. Johnson // *Annual Review of Phytopathology*. – 1984. – Vol. 22. – P. 309–330.
49. Leaf rust resistance gene *Lr67*, a third adult plant slow-rusting gene conferring resistance to multiple pathogens of wheat / C. Hiebert [et al.] // Abstracts of oral and poster presentations of 8th international wheat conference St. Petersburg, Russia 1–4 June 2010. – St. Petersburg, 2010. – P. 264.
50. Identification of microsatellite markers linked to leaf rust adult plant resistance (APR) gene *Lr48* in wheat / A. Singh [et al.] // *Plant Breeding*. – 2011. – Vol. 130. – P. 31–34.
51. *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat / S.A. Herrera-Foessel [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2012. – Vol. 124, № 8. – P. 1475–1486.
52. Achieving nearimmunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes / R.P. Singh [et al.] // *Acta phytopathologica et entomologica hungarica*. – 2000. – Vol. 35. – P. 133–139.
53. Multiple rust resistance and gene additivity in wheat: lessons from multi-location case studies in the cultivars Parula and Saar / M. Lillemo [et al.] // Global Rust Initiative Meeting, St. Paul. – 2011. – P. 111–120.
54. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts of wheat / R.P. Singh [et al.] // Increasing Wheat Production in Central Asia through Science and International cooperation: Proc. 1st Central Asian Wheat Conf. Almaty, Kazakhstan 10–13 June 2003. – Almaty, 2003. – P. 127–132.
55. Schafer, J.F. Estimated relation between numbers of urediniospores of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and rates of occurrence of virulence / J.F. Schafer, A.P. Roelfs // *Phytopathology*. – 1985. – Vol. 75. – P. 749–750.
56. Molecular and pathological characterization of slow rusting against leaf rust in common wheat / S. Kumar [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 245.
57. Rubiales, D. Characterization of *Lr34*, a major gene conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust / D. Rubiales, R.E. Niks // *Plant Disease*. – 1995. – Vol. 79. – P. 1208–1212.
58. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat / S.C. Krattinger [et al.] // *Science*. – 2009. – Vol. 323, № 5919. – P. 1360–1363.
59. Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens / E.S. Lagudah [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2009. – Vol. 119, № 5. – P. 889–898.
60. Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust / M. Winzeler [et al.] // *Agronomie*. – 2000. – Vol. 20. – P. 783–792.
61. Differential expression of partial resistance to wheat leaf rust in Mexico and The Southern Cone of America / S. German [et al.] // Abstracts of oral and poster presentations of 8th international wheat conference St. Petersburg, Russia 1–4 June 2010. – St. Petersburg, 2010. – P. 285–286.
62. Плотникова, Л.Я. Эффективность генов возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине *Lr22b*, *Lr34*, *Lr37* в Западной Сибири и цитофизиологическая основа их действия / Л.Я. Плотникова, Т.Ю. Штубей //

Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 123–131.

63. Global incidence of wheat rusts and powdery mildew during 1969–2010 and durability of resistance of winter wheat variety Bezostaya 1 / A. Morgounov [et al.] // European Journal of Plant Pathology. – 2012. – Vol. 132, № 3. – P. 323–340.

64. Tracking of powdery mildew and leaf rust resistance genes in *Triticum boeoticum* and *T. urartu*, wild relatives of common wheat / N.A. Hovhannisyan [et al.] // Czech. J. Genet. Plant Breed. – 2011. – Vol. 47, № 2. – P. 45–57.

65. Analysis of leaf and stripe rust severities reveals pathotype changes and multiple minor QTLs associated with resistance in an Avocet 3 Pastor wheat population / G.M. Rosewarne [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – Vol. 124, № 7. – P. 1283–1294.

66. The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar / M. Lillemo [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – Vol. 116. – P. 1155–1166.

67. A multiple resistance locus on chromosome arm 3BS in wheat confers resistance to stem rust (*Sr2*), leaf rust (*Lr27*) and powdery mildew / R. Mago [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2011. – Vol. 123, № 4. – P. 615–623.

68. Niks, E. Haustorium formation by *Puccinia hordei* in leaves of hypersensitive, partially resistant, and nonhost genotypes / E. Niks // Phytopathology. – 1983. – Vol. 73. – P. 64–66.

69. Niks, R.E. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialized fungal pathogens / R.E. Niks, D. Rubiales // Euphytica. – 2002. – Vol. 124, № 2. – P. 201–216.

70. Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.) / W. Spielmeyer [et al.] // Crop Science. – 2003. – Vol. 43. – P. 333–336.

71. Санин, С.С. Фитосанитарная обстановка на посевах пшеницы в Российской Федерации (1991–2008 гг.) (аналитический обзор) / С.С. Санин, Л.Н. Назарова // Защита и карантин растений. – 2010. – № 2. – С. 70–80.

Дата поступления статьи 22 октября 2012 г.

Е.А. Волуевич

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В СЕЛЕКЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ (обзорная статья)

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

Введение

Болезни и вредители сельскохозяйственных культур наносят значительный ущерб растениеводческой отрасли, снижая урожай и качество продукции. Использование химических средств защиты растений приводит к увеличению пестицидной нагрузки на окружающую среду. Кроме того, в популяциях вредоносных организмов накапливаются генотипы с мутациями резистентности к разным химическим классам фунгицидов и инсектицидов, что снижает эффективность их применения и требует разработки новых препаратов. В этой связи, менее дорогостоящим и экологически чистым способом борьбы с болезнями и вредителями является создание устойчивых сортов. Для успешной селекции необходим мониторинг частоты генов вирулентности в популяциях патогенов с учетом путей их миграции, а также создание

сортов на основе диверсификационных стратегий. На современном уровне пока возможны диверсификационные стратегии селекции только для некоторых культур и к небольшому числу патогенов, то есть диверсификационные стратегии на первичном уровне, который предполагает создание сортов, различающихся по генам устойчивости, и их территориальное размещение. В связи с биологическими особенностями разных видов вредоносных патогенов используются определенные генетические подходы к выведению резистентных сортов, направленные на увеличение длительности сохранения устойчивости. В настоящей статье будет рассмотрена диверсификационная стратегия селекции мягкой пшеницы на устойчивость к вредоносной и распространенной болезни этой культуры – мучнистой росе.

Биологические особенности возбудителя мучнистой росы пшеницы и вредоносность

Мучнистая роса встречается на пшенице во всех районах мира, где возделывается эта культура. Возбудитель мучнистой росы – биотрофный грибной патоген *Blumeria graminis* DC. f. sp. *tritici* Marchal (синоним *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Marchal) относится к классу *Ascomycetes*, порядку *Erysiphales*, семейству *Erysiphaceae*. Мучнистая роса, как правило, развивается на листьях, но гриб может поражать все надземные части растения. На поверхности пораженных органов патоген появляется в виде белого налета, который постепенно превращается в плотные колонии мицелия грязно-серовато-коричневого цвета. В условиях умеренного климата в течение вегетации растений гриб дает около 10 генераций путем бесполого размножения гаплоидными конидиями. При этом на поверхности листа в 1 см² может сформироваться до 100 тыс. конидий, что обуславливает возникновение 2000

мутаций на локус в сутки на 1 га площади посева пшеницы. Патоген легко преодолевает большие расстояния с помощью ветра. На примере возбудителя мучнистой росы ячменя было зарегистрировано, что по основному направлению ветра популяция *B. graminis* f. sp. *hordei* распространилась на 110 км за 36 дней [1]. Споры также разносятся с дождем и брызгами.

Патоген имеет регулярный половой процесс, в результате которого образуются аскоспоры. Их фомирование начинается при повышении температуры и старении растения-хозяина, в то время как бесполое размножение конидиями в этот период уменьшается, а затем прекращается. Аскоспоры разносятся ветром даже при высокой влажности воздуха после дождя, то есть в условиях, которые неблагоприятны для рассеивания конидий [2]. Смесь аскоспор и конидий, образовавшихся

на яровой пшенице, формирует инокулюмом для озимой пшеницы. Популяция возбудителя мучнистой росы увеличивается в течение осени на озимой пшенице до наступления холодов, ограничивающих ее дальнейшее развитие. Гриб зимует обычно в узлах кушения в виде мицелия. В морозные зимы, вызывающие серьезное повреждение озимой пшеницы, численность популяции патогена значительно снижается. Клейстотеции – плодовые тела с сумками, содержащими аскоспоры, – сохраняются на пожнивных остатках. Весной грибок развивается на озимой пшенице и конидии переносятся ветром на яровую пшеницу. С августа по октябрь созревают и высвобождаются аскоспоры, которые поражают всходы озимых. В засушливых районах тех стран, где выращивается только яровая пшеница, сумки формируются медленно, и аскоспоры созревают только после перезимовки, весной они поражают яровую пшеницу.

Возбудитель мучнистой росы принадлежит к патогенам высокого эволюционного риска, так как имеет половое и бесполое размножение [3]. В результате ежегодного полового процесса производится много новых комбинаций аллелей. Последующие циклы бесполого размножения могут быстро увеличить частоту отобранных комбинаций аллелей, поэтому разрушение эффективности генов устойчивости и чувствительности к фунгицидам происходит достаточно быстро. Стратегия эпифитотии гриба в основном базируется на быстром инфекционном цикле, большой споруляционной способности и высокой эффективности инфек-

ции. Увеличение степени развития болезни происходит не только вследствие появления новых поражений на растениях, но что более важно, путем увеличения размеров уже присутствующих колоний. Имея такие биологические особенности, возбудитель мучнистой росы быстро преодолевает устойчивость сорта, контролируемую главными генами: обычно в течение 3–4 лет возделывания на больших площадях, но это может происходить и быстрее – за 1–3 года [4].

Мучнистая роса является одной из наиболее вредоносных болезней пшеницы в странах с умеренным климатом, бурное развитие этой болезни наблюдается в Великобритании, Германии, Китае, России, Северной и Восточной Африке, на Юго-Востоке США, в Южной и Западной Азии, Японии [5]. Более сильно она распространена. В Европе споры возбудителя мучнистой росы пшеницы разносятся с Запада на Восток. Их распространение происходит по западно-европейскому пути (из Марокко и Испании – в Скандинавию), а также восточно-европейскому пути (из Турции и Румынии – в Скандинавию) [6]. В связи с этим на местные популяции гриба воздействует приток спор из отдаленных районов.

Потери урожая от мучнистой росы составляют от 13 до 34% [7, 8], при сильном поражении посевов – до 50% [9]. В Беларуси эта болезнь практически ежегодно достигает эпифитотийного уровня [10]. Мучнистая роса уменьшает ассимиляционную площадь листьев и разрушает хлорофилл, снижает кустистость растений и задерживает колошение.

Генетические подходы в селекции на расоспецифическую устойчивость

Селекция сортов пшеницы ведется на расоспецифическую и нерасоспецифическую устойчивость. Селекция на расоспецифическую устойчивость предполагает использование в скрещиваниях доноров с эффективными главными *Pm*-генами резистентности (*Pm* – powdery mildew). Устойчивость обычно проявляется в виде реакции сверхчувствительности на листьях [5]. Сорта с генами расоспецифической устойчивости характеризуются резистентностью на протяжении всего вегетационного периода растений, начиная со стадии проростков. Однако они быстро становятся восприимчивыми. Основная причина эрозии

их устойчивости – адаптация популяции возбудителя мучнистой росы в результате половой рекомбинации, мутаций, миграции на дальние расстояния и сильного давления отбора, оказываемого главными генами резистентности, содержащимися в сортах.

Считается, что пирамидирование эффективных главных генов обеспечивает более длительную устойчивость. Однако пирамиды оказываются уязвимыми, если включенные в них гены используются одиночно в других сортах и в популяции патогена присутствует комплементарная к ним вирулентность [11]. Если при мониторинге популяции патогена

обнаружено появление новых фенотипов вирулентности, преодолевающих используемую пирамиду генов, то можно предполагать, что в целях предотвращения потери устойчивости следует увеличить численность генов пирамиды. Однако предсказать длительность устойчивости сорта в зависимости от числа присутствующих у него генов резистентности невозможно. Самая большая опасность при включении новых главных генов в генные пирамиды заключается в том, что сильное однонаправленное давление отбора в отношении соответствующих аллелей вирулентности в популяции патогена может приводить к эволюции патотипа, преодолевающего комплекс этих генов [12]. Если одна и та же комбинация генов устойчивости используется широко, то будет наблюдаться более сильное давление отбора на соответствующую комбинацию аллелей вирулентности в популяции возбудителя. Если это происходит, то эффективность пирамиды данных генов устойчивости будет разрушена. Таким образом, несмотря на то, что присутствие в сорте нескольких эффективных генов должно обеспечивать более длительную устойчивость [12], такая устойчивость может способствовать накоплению генотипов патогена, несущих многие гены вирулентности, если осуществляется высокое давление отбора на возбудителя болезни [13].

Для успешной селекции на расоспецифическую устойчивость необходимо располагать информацией об эффективности главных генов резистентности, а также их наличии в донорах. Кроме того, для целенаправленного отбора предпочтительных генотипов в гибридных поколениях желательно использовать ДНК-маркеры, разработанные к генам устойчивости.

Для исследования эффективности генов устойчивости впервые в 2010 году был проведен мониторинг частоты встречаемости генов вирулентности в белорусской популяции гриба. Инфекционный материал возбудителя мучнистой росы собирали на коллекционном участке в Минской области, где произрастали около 500 яровых и озимых сортообразцов различного географического происхождения. Встречаемость генов вирулентности исследовали, используя набор, включающий 21 тестер с одиночными генами (8 изогенных линий и

13 сортов), а также 5 сортообразцов, содержащих от двух до пяти генов устойчивости. Оказалось, что только пшеничный ген *Pm3b* и ген от ржи *Pm20* были среднеэффективными. Частота вирулентных к ним клонов составляла 8,7% при оценке изогенной линии Chul/8*Chancellor и образца KS93WGRC28 соответственно [14]. Низкоэффективными оказались гены *Pm1a*, *Pm3a*, *Pm3d*, *Pm6*, *Pm7*, *Pm16*, *Pm17* с частотой вирулентности в пределах 21–50%. Неэффективны гены устойчивости *Pm1a*, *Pm1e*, *Pm2*, *Pm3c*, *Pm3f*, *Pm3g*, *Pm4a*, *Pm4b*, *Pm5a*, *Pm5b*, *Pm10*, к которым в белорусской популяции гриба присутствовало более 50% вирулентных изолятов. Среднеэффективной оказалась комбинация четырех генов у сорта Sappo (*Pm1a+2+4b+9*); низкоэффективными были комбинации трех генов у сорта Normandie (*Pm1a+2+9*) и пяти генов у сорта Nemaes (*Pm1a+2+4b+6+9*); неэффективной – комбинация двух генов у сорта Chinese Spring (*Pm11+15*).

В некоторых европейских странах, из которых не исключен занос спор гриба в Республику Беларусь, также проводятся исследования структуры популяции патогена по признаку вирулентности с целью изучения эффективности генов устойчивости и прогноза их использования в селекции. Так, в Дании частота вирулентности составляла 100% к гену *Pm5*, 80–90% к *Pm8* и 40–90% к *Pm2* (по данным оценки 1985–1986 гг.) [15]. Комбинация генов *Pm4b+6* обеспечивала хороший уровень защиты. Сорта Kosack (*Pm4b+u*) (*u* – unknown), Sleipner (*Pm2+6+8*) и Holger (*Pm6+u*) были наиболее устойчивы. Отмечалась некоторая вирулентность к *Pm1*, *Pm4a*, *Pm3a*, *Pm3b*, *Pm3c*, несмотря на то, что сорта с этими генами устойчивости в Дании не выращивались широко. В Голландии в 1970-х годах частота вирулентных изолятов к генам *Pm1a*, *Pm2*, *Pm3b*, *Pm6* и *Pm8* была небольшой. Наиболее распространенными оказались изоляты с вирулентностью к *Pm5*, наименее – к *Pm4b* [16]. Отмеченная в 1980–1990 гг. вирулентность к генам *Pm1a*, *Pm2*, *Pm3a-d*, *Pm4a*, *Pm4b*, *Pm5a*, *Pm6*, *Pm8* и *Pm9* обусловлена увеличением выращивания сортов пшеницы, содержащих эти гены [15–17]. В Германии гены *Pm4b* и *Pm5* потеряли эффективность, также как и гены *Pm2*, *Pm6*, *Pm8* и все их совместные комбинации [18].

В Венгрии за период с 1970-х годов по 2007 год было показано, что 60% изменений в частоте вирулентных генов объясняется набором культивируемых сортов [19]. В 2001–2008 гг. меньшую частоту вирулентности выявили по отношению к гену *Pm3b* (24,7%), в то время как к *Pm3d* она составляла 27,3%; к комбинации генов *Pm1+2+9* – 41,3%; к гену *Pm1* – 48,7%. Около 100% составляла частота вирулентных изолятов к генам *Pm2*, *Pm3c*, *Pm4a*, *Pm5*, *Pm6* и *Pm8* [19]. В Беларуси ген *Pm3d* был низкоэффективным при анализе частоты встречаемости изолятов в 2010 году [14].

В Болгарии изучение структуры популяции возбудителя мучнистой росы в 2001–2003 гг. показало наибольшую эффективность генов *Pm7*, *Pm3b*, *Pm3c* и *Pm1+2+9* [20]. По результатам изучения в 2004–2006 гг. высокую эф-

фективность имели гены *Pm7*, *Pm3b*, *Pm3c* и комбинация генов *Pm1+2+9* [21]. Однако в Беларуси эта комбинация генов оказалась низкоэффективной, по данным мониторинга популяции гриба в 2010 году было выявлено 44,4% вирулентных изолятов к сорту Normandie [14].

В Литве исследование структуры популяции патогена с использованием дифференциаторов с генами *Pm1*, *Pm2*, *Pm3a*, *Pm3b*, *Pm3c*, *Pm4a*, *Pm4a+*, *Pm4b*, *Pm4b+*, *Pm5*, *Pm6*, *Pm7*, *Pm8*, *Pm17*, *Pm1+Pm4b*, *Pm1+Pm2+Pm9*, *Pm2+Pm6*, *Pm2+Pm1d* показало их неэффективность. Сравнительно меньшую частоту вирулентных изолятов наблюдали только к генам *Pm4a* (Khapli), *Pm4a+* (Tr 309/A) и *Pm17* (Amigo): в диапазоне от 20,7% до 37% (средние данные за 3 года) [22].

Генетические подходы в селекции на возрастную устойчивость

Сорта с медленным развитием болезни, частичной, возрастной (APR – adult plant resistance) устойчивостью характеризуются задержкой проявления болезни, уменьшением роста и репродукции патогена на взрослых растениях [23]. Она обычно оценивается по снижению развития болезни на флаговом (и подфлаговом) листе, так как возрастные гены начинают экспрессироваться с периода появления этого листа. Если сорта имеют только этот тип устойчивости, то проростки могут поражаться в слабой или средней степени [24, 25]. Возрастная устойчивость обычно нераспецифическая и в таких случаях является длительной, но она может быть также распецифической, что было доказано экспериментально [26]. С нераспецифической устойчивостью к мучнистой росе связаны локусы частичной устойчивости к листовой и желтой ржавчине (*Lr34/Yr18/Pm38* и *Lr46/Yr29/Pm39*) (*Lr* – leaf rust, *Yr* – yellow rust) [27–29]. Они присутствуют в различной зародышевой плазме и контролируют частичную устойчивость к трем грибным патогенам в течение нескольких десятилетий [29–32].

Медленное развитие мучнистой росы чаще всего наследуется как количественный признак [33, 34]. Например, генетический анализ с использованием двух серий моносомных линий показал участие 14 хромосом в детерминации полевой устойчивости к мучнистой росе немецкого сорта Diplomat [35]. Однако

возможно и простое наследование при проведении генетического анализа в строго контролируемых условиях среды, например, у сорта Genesee был выявлен один доминантный расоспецифический ген частичной устойчивости [36]. Отбор по фенотипу на частичную полевую устойчивость к мучнистой росе часто затруднен в присутствии генов расоспецифической устойчивости, которые могут маскировать эффект генов частичной устойчивости, если являются эффективными. Кроме того, гены расоспецифической устойчивости могут обуславливать реакции частичного поражения болезнью в поле, когда частота соответствующей вирулентности в популяции патогена является низкой [37].

Возрастная устойчивость длительна благодаря нераспецифичности, вследствие чего оказывается менее сильное давление отбора на популяцию гриба [38]. Однако длительность устойчивости может быть определена лишь после продолжительного времени выращивания сорта на большой площади в регионе, где патоген вызывает регулярные эпифитотии [39]. Так, например, британский сорт Maris Huntsman постоянно проявлял высокий уровень устойчивости к мучнистой росе, чем другие сорта, несущие аналогичную комбинацию неэффективных генов *Pm2+6* [5]. Немецкие сорта, имеющие неэффективную комбинацию *Pm*-генов, такие как реализованные в 1995 году Tambor (*Pm2+5*) и в 1970 году Nabicht

(*Pm5+6*), а также Ramiro (1989 г.), Miras (1984 г.) и Zentos (1989 г.) без главных *Pm*-генов характеризуются хорошей количественной устойчивостью, несмотря на интенсивное использование в практической земледелии. Известно, что сорта Zentos, Ramiro и Miras (TAW) имеют в своей родословной российский сорт Мироновская 808. Мироновская 808 обладает количественной устойчивостью к мучнистой росе, которая сохранялась в Германии в течение длительного периода времени (1970–1982 гг.) несмотря на то, что в этой стране 43% площади под пшеницей было занято данным сортом [40]. Ранее сообщалось о высокой стабильности количественной устойчивости к мучнистой росе сорта Кнох и его производных, которая не изменилась в течение 20 лет [23]. Сорт Massey, производный Кнох 62, начали выращивать в Вирджинии в 1981 году [41] и до сих пор он устойчив к мучнистой росе на стадии взрослых растений [42]. Выявлено, что долговременную возрастную устойчивость американских сортов Кнох 62 и Massay обеспечивают 2–3 гена [43].

Создание сортов с частичной (количественной) устойчивостью возможно за счет остаточного эффекта преодоленных генов расоспецифической устойчивости. Так, установлено, что некоторые неэффективные расоспецифические гены устойчивости (*Pm3c*, *Pm3g*, *Pm4b*) вносят остаточный эффект в возрастную устойчивость [44, 45]. Сообщалось также, что расоспецифический ген *Pm5a*, возможно, обуславливает возрастную устойчивость в сочетании с другими *Pm*-генами [46]. В условиях Словакии выявили два сорта (Century и Vercors) с количественной устойчивостью, которые имеют частично эффективные (к некоторой доле изолятов в популяции гриба) главные гены *Pm17* и *Pm3a* в комбинации с геном *pm5c* соответственно [47].

В полевых условиях Беларуси также была оценена эффективность одиночных генов и их комбинаций по проценту поражения третьего листа сверху и флагового листа растений [48]. Высокую устойчивость в 2001–2002 гг. наблюдали у сортообразцов с одиночными генами: Aristide (*Pm3g*), Transec (*Pm7*), Haven/T. dicoccoides (*Pm16*), Amigo (*Pm17*), KS93WGRC28 (*Pm20*), Fresco (*MIfr*), Spark (*PmMlTo*). Слабое поражение болезнью имели сорта с комбинацией 2–5 генов: Compal

(*Pm2+4b*), Maris Huntsman (*Pm2+6*), Булава (*Pm2+6*), Brock (*Pm2+MlTa2*), Sorbas (*Pm4b+6*), Mercia (*Pm5b+MlTa2*), Hereward (*Pm8+MlHe2*), Normandie (*Pm1a+2+9*), Axona (*Pm2+3d+Mld*), Kenja Civet (*Pm2+3c+6*), Apollo (*Pm2+4b+8*), Crossbow (*Pm2+5+6*), Knirps (*Pm2+4b+6+8*), Nemaes (*Pm1a+2+4b+6+9*).

Проведенная в 2012 году полевая оценка также выявила высокую устойчивость некоторых сортов с известными генами и их комбинациями. Такой устойчивостью характеризовались яровые сортообразцы Transec (*Pm7*), Тулайковская 5 (*PmAg*), Тулайковская 10 (*PmAg*), Maris Dave (*Pm2+Mld*), Wembley/*Ae. speltoides* (*Pm12+MlSo*), Axona (*Pm2+3d+Mld*), Vanti (*Pm1+2+3d+6*). Высокий уровень полевой устойчивости наблюдали у озимых сортов Soissons (*Pm3g*), Amigo (*Pm17*), KS93WGRC28 (*Pm20*), Spark (*PmMlTo*), Tambor (*Pm2+5*), Estica (*Pm2+6*), Булава (*Pm2+6*), Mercia (*Pm5b+MlTa2*).

Некоторые сортообразцы, несущие гены *Pm7*, *Pm17*, *Pm20*, *PmMlTo*, сохраняли хороший уровень полевой устойчивости к белорусской популяции возбудителя мучнистой росы более 10 лет. Высоко устойчивы, по данным оценки ряда лет, были сорта Тулайковская 5 и Тулайковская 10 с геном *PmAg* (2009–2012 гг.), Tambor с *Pm2+5* (2008–2012 гг.), Булава с *Pm2+6* (2001–2012 гг.), Mercia с *Pm5b+MlTa2* (2001–2012 гг.). Эти сорта характеризовались устойчивостью как третьего листа сверху, так и флагового листа. Сорта Axona с *Pm2+3d+Mld* (оценки 2001–2012 гг.) и Vanti с *Pm1+2+3d+6* (2009–2012 гг.) были более устойчивы на флаговом листе, чем на третьем листе сверху, то есть проявляли устойчивость по типу медленного развития мучнистой росы. Такую же устойчивость в условиях Беларуси имел сорт Estica с комбинацией генов *Pm2+6* по данным оценок 2008–2012 гг.

Сортообразцы с некоторыми генами или комбинациями генов имеют высокий уровень полевой устойчивости, начиная со стадии колошения растений, хотя частота вирулентных к ним клонов при лабораторной оценке проростков была существенной. Это имеет отношение, в частности, к носителям генов *Pm3g*, *Pm7*, *Pm17*, из которых только *Pm7* – возрастной расоспецифический ген частичной устойчивости. Высокий уровень полевой устойчивости

к белорусской популяции наблюдали у озимого сорта *Vlasta* по данным оценок 2008–2012 гг. Это лучший по устойчивости к мучнистой росе чешский сорт, полученный от скрещивания *Brimstone/S13/Hana* и реализованный в 1999 [49]. Сорт *Vlasta* имеет ген *Pm1b*, интрогрессированный от *Triticum monococcum* в *S13* [50]. Однако с помощью фитотеста ген *Pm1b* в сорте *Vlasta* найден не был, но были постулированы гены *Pm2* и *Pm6*, очевидно, полученные от *Brimstone* (неопубликованные данные Zeller, цит. по [50]). Присутствие только комбинации этих двух генов *Pm2+6* не может объяснить высокую полевую устойчивость сорта *Vlasta* к мучнистой росе, так как другие сорта (например, *Estica*) с этими же генами были неустойчивы в Чехии в 2002–2005 гг. [49]. В условиях Беларуси сорта *Estica* и *Булава*, имеющие комбинацию генов *Pm2+6*, как уже отмечалось, характеризовались хорошим уровнем полевой устойчивости, хотя по данным мониторинга 2010 г. к каждому из этих генов наблюдалась значительная частота вирулентных изолятов [14].

Пирамидирование расоспецифических главных генов, которые уже преодолены, все-таки не является эффективным решением проблемы генетической защиты сортов пшеницы от мучнистой росы. Ранее об этом сообщалось при анализе устойчивости английских [5] и немецких сортов [18]. Было выявлено, что сочетания малых генов устойчивости к мучнистой росе, которые селекционеры смогли получить в некоторых сортах в прошлом, являются намного более эффективными для достижения экологически стабильной устойчивости к болезни, чем пирамидирование преодоленных генов расоспецифической устойчивости. Так, на протяжении 10-летнего изучения немецких сортов озимой пшеницы с частичной устойчивостью к мучнистой росе, степень их поражения была ниже 10%, несмотря на эпифитотии [18]. Только в особенно благоприятные для гриба годы развитие болезни достигало 20%, что требовало применения фунгицидов. Такая устойчивость не была обусловлена присутствием у некоторых исследованных сортов известных преодоленных генов расоспецифической устойчивости, поскольку аналогичные сочетания генов у других сортов не давали приемлемого уровня частичной устойчивости. В связи с этим мож-

но предположить, что и выявленная в условиях Беларуси высокая полевая устойчивость некоторых сортов с неэффективными расоспецифическими генами или их комбинациями может быть обусловлена и другими (малыми) генами.

В последнее время особое значение приобретает изучение частичной устойчивости, которая, как количественный признак, контролируется полигенами. Если признак является результатом многочисленных малых аддитивных эффектов, то в селекции такую устойчивость использовать сложно. Однако выявление QTLs (quantitative trait loci – количественных локусов), ассоциированных с устойчивостью к мучнистой росе, особенно у сортов с длительной частичной устойчивостью, позволяет использовать их при выведении сортов, адаптированных к местным условиям. Такие исследования были проведены в Норвегии: была изучена генетика резистентности шведского сорта мягкой озимой пшеницы *Folke*, имеющего долговременную частичную неспецифическую полевую устойчивость к мучнистой росе [37]. Этот сорт адаптирован к условиям Норвегии [51], и он широко культивировался в Норвегии и Швеции в 1980-х и 1990-х годах соответственно. Недавно проведенные тесты на проростках подтвердили нерасоспецифическую природу его устойчивости [52, 53]. Также ни один из QTLs, ассоциированных с длительной устойчивостью к мучнистой росе у сорта *Folke*, не был картирован в позиции любых известных генов расоспецифической резистентности [54]. Это является дополнительным подтверждением нерасоспецифичности *Folke* при высоком уровне возрастной устойчивости растений в полевых условиях [51]. Селекция, основанная на QTLs (количественных генах), которые имеет *Folke*, перспективна в связи с тем, что новые сорта будут иметь устойчивость, которую трудно преодолеть генетическими изменениями в популяции возбудителя мучнистой росы.

Ценным источником для селекции на частичную устойчивость к мучнистой росе является немецкий сорт яровой пшеницы *Naxos*, который проявляет высокий уровень нерасоспецифической полевой устойчивости. Lu с сотрудниками выявили у *Naxos* большой QTL -локус количественной устойчивости в хромосоме 1AS вблизи гена *Pm3* в экспериментах, проведенных в 6 разных местностях

в Норвегии и Китае. Этот локус объясняет до 35% фенотипической вариации [55]. *Naxos* имеет еще один важный локус количественной устойчивости в хромосоме 2DL и два малых – в 2BL и 7DS. Кроме *Naxos* и *Folke*, высоким уровнем частичной полевой устойчивости обладают немецкий сорт яровой пшеницы *Paos*

и шведский озимый сорт *Mjølneg*. Все эти 4 сорта на ювенильной стадии являются восприимчивыми к изолятам патогена, то есть не несут генов расоспецифической устойчивости, поэтому представляют собой высокоценные источники частичной и потенциально длительной устойчивости к мучнистой росе [56].

Заключение

Распространение возбудителя мучнистой росы на длинные дистанции требует организации интродукции эффективных генов устойчивости поперек пути основного направления ветра в Европе – с Запада на Восток. Существует необходимость расширения генетического разнообразия устойчивости к мучнистой росе в возделываемых сортах пшеницы. Поиск и интродукция новых генов устойчивости от родственных и чужеродных видов в адаптированные сорта пшеницы – первичные задачи селекционных программ по выведению сортов для выращивания в тех районах, где эта болезнь является проблемой, в том числе в Беларуси. Чем более широкий спектр генетической устойчивости будет создан в адаптированных сортах, тем успешнее может использоваться стратегия диверсификации для контроля болезни, причем, озимые и яровые сорта должны иметь различающиеся гены устойчивости. Прогноз использования генов устойчивости в селекции должен основываться на мониторинге популяции возбудителя мучнистой росы по генам вирулентности.

Для создания устойчивых сортов пшеницы к мучнистой росе исследователями предложены программы селекции, включающие использование эффективных главных генов устойчивости, их пирамидирование, пирамиды преодоленных главных генов, а также создание сортов с частичной (количественной) устойчивостью. В то же время селекция сортов с частичной устойчивостью предлагается в качестве более надежного направления [5, 23]. Изучение генетики

количественной устойчивости или медленного развития болезни на взрослых растениях является важной задачей. Без знания генетической основы этой ценной формы устойчивости, эффективную стратегию селекции на устойчивость к мучнистой росе разработать трудно. В настоящее время провести различие между количественной и длительной устойчивостью возможно только ретроспективно. Сорта с количественной или сочетанием количественной и качественной устойчивости для условий, где имеет значение проростковая устойчивость, могут быть легко разработаны с использованием молекулярных маркеров [57]. Пирамиды количественных генов с качественными генами увеличат длительность устойчивости [58].

Пирамидирование генов имеет большие перспективы для достижения длительной устойчивости сельскохозяйственных культур к биотическим и абиотическим стрессам [59]. Пирамидирование с использованием молекулярных маркеров к генам устойчивости позволяет осуществлять «укладку» многих генов, что приводит к одновременной экспрессии более одного гена и длительной устойчивости. Генные пирамиды приобретают большое значение для создания генетических источников широкого спектра устойчивости. Эта стратегия должна быть интегрирована в обычные селекционные программы. Повысить эффективность такой селекции позволяет маркер-сопутствующий отбор, который должен использоваться и в Республике Беларусь.

Список используемых источников

1. Limpert, E. Barley mildew in Europe: Evidence of wind-dispersal of the pathogen and its implications for improved use of host resistance and of fungicides for mildew control / E. Limpert // *Integrated Control of Cereal Mildews: Monitoring the Pathogen*; ed. M.S. Wolfe, E. Limpert. – Dordrecht: Martinus Nijhof Publishers,

1987. – P. 31–33.

2. Development of cleistothecia and early ascospore release of *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* in winter wheat in relation to host age and climatic conditions / M. Götz [et al.] // *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. – 1996. – Vol. 103. – P. 134–141.

3. McDonald, B.A. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance / B.A. McDonald, C. Linde // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 2002. – Vol. 40. – P. 349–379.
4. Skinnnes, H. Breakdown of race specific resistance to powdery mildew in Norwegian wheat / H. Skinnnes // *Cereal Rusts Powdery Mildew Bull* 30. – 2002. – Mode of access: <http://www.crpmb.org>. – Date of access: 12.11.2012.
5. Bennett, F.G.A. Resistance to powdery mildew in wheat: A review of its use in agriculture and breeding programmes / F.G.A. Bennett // *Plant Pathology.* – 1984. – Vol. 33. – P. 279–300.
6. Zadoks, J.C. International dispersal of fungi / J.C. Zadoks // *Netherlands Journal of Plant Pathology.* – 1967. – Vol. 73, Suppl. 1. – P. 61–80.
7. Effectiveness of adult-plant resistance in reducing grain yield loss to powdery mildew in winter wheat / C.A. Griffey [et al.] // *Plant Disease.* – 1993. – Vol. 77. – P. 618–622.
8. Leath, S. Effects of powdery mildew, triadimenol seed treatment, and triadimefon foliar sprays on yield of winter wheat in North Carolina / S. Leath, K.L. Bowen // *Phytopathology.* – 1989. – Vol. 79. – № 2. – P. 152–155.
9. Рачински, Т. Съвременната селекция и борбата с ръждите и бряшнестата мана на пшеница / Т. Рачински // *Раст. защита.* – 1980. – Т. 28. – № 8. – С. 5–10.
10. Коптик, И.К. Селекция озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях Беларуси: дисс. ... доктора с.-х. наук: 06.01.05 / И.К. Коптик; БелНИИЗиК. – Жодино, 1996. – 304 с.
11. Parlevliet, J.E. Resistance of Crop Plants against Fungi / J.E. Parlevliet // *Durable resistance*; ed. H. Hartleb, R. Heitfuss, H.-H. Hoppe. – Jena: Gustav Fisher Publishers, 1997. – P. 238–253.
12. Pink, D.A.C. Strategies using genes for non-durable disease resistance / D.A.C. Pink // *Euphytica.* – 2002. – Vol. 124. – P. 227–236.
13. Groth, J.V. Multilines and “super-races”, a simple model / J.V. Groth // *Phytopathology.* – 1976. – Vol. 66. – P. 937–939.
14. Булойчик, А.А. Анализ белорусской популяции возбудителя мучнистой росы пшеницы по признаку вирулентности / А.А. Булойчик, В.С. Борзяк // *Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. акад. Н.В. Турбина, Минск, 8–11 окт. 2012 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, X съезд Белорус. общ-ва генетиков и селекционеров; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2012. – С. 45.*
15. Hovmøller, M.S. Virulensundersøgelser af byg- og hvedemeludug i Danmark 1987 / M.S. Hovmøller // *Tidskr. Planteavl.* – 1987. – Vol. 91. – P. 375–386.
16. Karjalainen, R. The powdery mildew situation on barley and wheat in Finland // *Integrated Control of Cereal Mildews: Monitoring the pathogen* / R. Karjalainen; ed. M.S. Wolfe, E. Limpert. – The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. – P. 61–66.
17. Wiik, L. Mildew populations of barley and wheat in Sweden / L. Wiik // *Integrated Control of Cereal Mildews: Virulence Patterns and Their Change*; ed. J. Helms-Jørgensen. – Roskilde: Risø National Laboratory, 1991. – P. 33–37.
18. Miedaner, T. Effectiveness and environmental stability of quantitative powdery mildew (*Blumeria graminis*) resistance among winter wheat cultivars / T. Miedaner, K. Flath // *Plant Breeding.* – 2007. – Vol. 126. – P. 553–558.
19. Virulence of the wheat powdery mildew population and the efficiency of *Pm* resistance genes / G. Vida [et al.] // *8th International Wheat Conference, Abstracts of oral and poster presentations, St. Petersburg, 1–4 June 2010.* – St. Petersburg, 2010. – P. 325–326.
20. Iliev, I. Вирулентност на причинителя на брашнестата мана по пшеницата през периода 2001–2003 г. / I. Iliev // *Растениевъдни Науки.* – 2006. – Vol. 43, № 4. – P. 344–351.
21. Iliev, I. Virulence Diversity in the Population of the Cause Agent of Powdery Mildew in Wheat – *Blumeria graminis tritici* / I. Iliev // *Bulgarian Journal of Ecological Science.* – 2011. – Vol. 10, № 3. – P. 3–13.
22. Liatukas, Z. Wheat powdery mildew population in Lithuania / Z. Liatukas, V. Ruzgas // *Agronomijas Vestis.* – 2005. – № 8. – P. 124–128.
23. Shaner, G. Evaluation of slow-mildewing resistance of Knox wheat in the field / G. Shaner // *Phytopathology.* – 1973. – Vol. 63. – P. 867–872.
24. A major QTL effect controlling resistance to powdery mildew at the adult plant stage / Y. Bougot [et al.] // *Plant Breeding.* – 2006. – Vol. 125. – P. 550–556.

25. Quantitative trait loci mapping of adult-plant resistance to powdery mildew in Chinese wheat cultivar Lumai 21 / C.X. Lan [et al.] // *Molecular Breeding*. – 2010. – Vol. 25. – P. 615–622.
26. Hsam, S.L.K. Breeding for powdery mildew resistance in common wheat (*T. aestivum* L. em Thell.) / S.L.K. Hsam, F.J. Zeller // *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*; ed. R.R. Belanger [et al.]. – St. Paul, USA: PS Press, 2002. – P. 219–238.
27. Mapping *Yr28* and other genes for resistance to stripe rust in wheat / R.P. Singh [et al.] // *Crop Science*. – 2000. – Vol. 40, № 4. – P.1148–1155.
28. Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust co-segregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat / W. Spielmeier // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2005. – Vol. 111. – P. 731–735.
29. The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar / M. Lillemo [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2008. – Vol. 116. – P. 1155–1166.
30. Kolmer, J.A. Genetics of resistance to wheat leaf rust / J.A. Kolmer // *Annual Review of Phytopathology*. – Vol. 34. – P. 435–455.
31. *Lr46*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat / R.P. Singh [et al.] // *Phytopathology*. – 1998. – Vol. 88, № 9. – P. 890–894.
32. Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene *Lr46* and its association with stripe rust resistance gene *Yr29* in wheat / M. William [et al.] // *Phytopathology*. – 2003. – Vol. 93. – P. 153–159.
33. Roberts, J.J. General resistance (slow mildewing) to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in Knox wheat / J.J. Roberts, R.M. Caldwell // *Phytopathology*. – 1970. – Vol. 60. – P. 1310.
34. Effectiveness of adult-plant resistance in reducing grain yield loss to powdery mildew in winter wheat / C.A. Griffey [et al.] // *Plant Disease*. – 1993. – Vol. 77. – P. 618–622.
35. Chae, Y.-A. Genetic analysis of powdery mildew resistance in wheat cultivar ‘Diplomat’ / Y.-A. Chae, G.W. Fischbeck // *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*. – 1979. – Vol. 83. – P. 272–280.
36. Ellingboe, A.H. Genetics of host-parasite interactions / A.H. Ellingboe // *Physiological Plant Pathology*; ed. R. Heitefuss, P.H. Williams. – Berlin: Springer-Verlag, 1976. – P. 761–778.
37. Molecular mapping of partial resistance to powdery mildew in winter wheat cultivar Folke / M. Lillemo [et al.] // *Euphytica*. – 2012. – Vol. 185. – P. 47–59.
38. Parlevliet, J.E. Durable resistance in self-fertilizing annuals / J.E. Parlevliet // *Durable Resistance in Crops*; ed. F. Lamberti [et al.]. – New York, USA: Plenum Press, 1983. – P. 347–360.
39. Johnson, R. Durable resistance: definition of genetic control and attainment in plant breeding / R. Johnson // *Phytopathology*. – 1981. – Vol. 22. – P. 309–330.
40. Meinel, A. Breeding aspects of partial resistance to airborne pathogens in wheat / A. Meinel, O. Unger // *Czech. J. Genet. Plant Breed.* – 1998. – Vol. 34. – P. 103–106.
41. Registration of Massey wheat / T.M. Starling [et al.] // *Crop Science*. – 1984. – Vol. 24. – P. 1000.
42. Powdery mildew resistance genes in wheat: identification and genetic analysis / M.A. Alam [et al.] // *Journal of Molecular Biology Research*. – 2011. – Vol. 1, № 1. – P. 20–39.
43. Griffey, C.A. Inheritance of adult-plant resistance to powdery mildew in Knox 62 and Massey winter wheats / C.A. Griffey, M.K. Das // *Crop Science*. – 1994. – Vol. 34. – P. 641–646.
44. Mapping QTL involved in adult plant resistance to powdery mildew in the winter wheat line RE714 in two susceptible genetic backgrounds / D. Mingeot [et al.] // *Plant Breeding*. – 2002. – Vol. 121. – P. 133–140.
45. Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. II. Adult plant resistance / S. Paillard [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2002. – Vol. 101, № 3. – P. 457–462.
46. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). 6. Alleles at the *Pm5* locus / S.L.K. Hsam [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2001. – Vol. 102. – P. 127–133.
47. Bojnanska, K. Resistance and genes of resistance against powdery mildew of selected wheat genetic resources / K. Bojnanska // *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*. – 2009. – Vol. 55, № 1. – P. 42–48.

48. Эффективность генов устойчивости к мучнистой росе мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в Беларуси / Е.А. Волуевич [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2006. – № 3. – С. 51–56.
49. Theoretical Bases and Sources for Breeding Wheat for Combined Disease Resistance / Sip V. [et al.] // Czech J. Genet. Plant Breed. – 2005. – Vol. 41, № 4. – P. 127–143.
50. Zeller, F.J. Progress in breeding for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L.) / F.J. Zeller, S.L.K. Hsam // Proc. 9th Int. Wheat Genetics Symp., Saskatoon, 2–7 August 1998. / University of Saskatchewan; ed. A.E. Slinkard. – Saskatoon, Canada, 1998. – Vol. 1. – P. 178–180.
51. Fajerson, F. Weibulls Folke høsthvete / F. Fajerson, G. Svensson // Agri Hortique Genetica. – 1982. – Vol. 40. – P. 5–28.
52. Powdery mildew resistance in 155 Nordic bread wheat cultivars and landraces / S.C. Hysing [et al.] // Hereditas. – 2007. – Vol. 144. – P. 102–119.
53. Race specific resistance to powdery mildew in Scandinavian wheat cultivars, breeding lines and introduced genotypes with partial resistance / M. Lillemo [et al.] // Plant Breeding. – 2010. – Vol. 129. – P. 297–303.
54. Huang, X.Q. Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: a review / X.Q. Huang, M.S. Roder // Euphytica. – 2004. – Vol. 137. – P. 203–223.
55. Partial resistance to powdery mildew in German spring wheat ‘Naxos’ is based on multiple genes with stable effects in diverse environments / A. Lu [et al.] // Theor Appl Genet. – 2012. – Vol. 125. – P. 297–309.
56. Race specific resistance to powdery mildew in Scandinavian wheat cultivars, breeding lines and introduced genotypes with partial resistance / M. Lillemo [et al.] // Plant Breeding. – 2010. – Vol. 129. – P. 297–303.
57. MLAG12: a *Triticum timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene in common wheat on chromosome 7AL / J.J. Maxwell [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2009. – Vol. 119. – P. 1489–1495.
58. Seedling and adult plant resistance to powdery mildew in Chinese Bread Wheat Cultivars and Lines / Z.L. Wang [et al.] // Plant Disease. – 2005. – Vol. 89. – P. 457–463.
59. Joshi, R.K. Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops / R.K. Joshi, S. Nayak // Biotechnology and Molecular Biology Review. – 2010. – Vol. 5, № 3. – P. 51–60.

Дата поступления статьи 29 октября 2012 г.

ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ЧЕЛОВЕКА И БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ (обзорная статья)

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

Максимальная длительность жизни человека сегодня оценивается приблизительно в 115–120 лет. Считается, что это и есть тот срок, когда организм даже при самых благоприятных условиях жизни при отсутствии болезней, серьезных травм, экстремальных состояний и т.п. исчерпывает свои генетически запрограммированные витальные потенции: эффективность систем энергопродукции, систем сохранения и экспрессии генетической информации, свои адаптивные возможности; то есть способность поддерживать иерархически сопряженные гомеостатические системы (клетка – ткань – орган – система – целостный организм), активность репарационных механизмов, иммунный потенциал, свою личностную психоэмоциональную и интеллектуальную идентичность на уровне, совместимом с жизнью. Увеличение длительности человеческой жизни сверх максимальной черты, очевидно, должно быть следствием радикального вмешательства в многочисленные генетические факторы долголетия [1].

За последние две тысячи лет средняя длительность жизни человека неуклонно возрастала [1], что, без сомнения, стало следствием экономического, социального и научного прогресса человечества. Если в Древнем Риме в начале новой эры средняя длительность жизни едва достигала 25 лет, то на сегодня она составляет в развитых странах для мужчин 74–78 лет, для женщин – 81–85 лет.

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), среди причин смертности населения первое место устойчиво сохраняют сердечно-сосудистые заболевания, далее идут злокачественные опухоли и заболевания дыхательной системы. Бурное развитие производства синтетических препаратов и их не всегда достаточно рационально обоснованное применение привели к тому, что сотни тысяч людей ежегодно умирают от вредного действия фармакологиче-

ских препаратов. Смертность по этой причине вышла на пятое место после травм. Это, а также ряд других причин (настороженное отношение к химическим препаратам, все возрастающая аллергия населения, быстрое изменение условий жизни, демографической ситуации, причин смертности) обуславливают переход прежде всего к препаратам растительного происхождения, как к современной (иногда – умышленно прочно забытой) альтернативе синтетическим.

75% всех больных, считают эксперты ВОЗ, правильнее лечить не синтетическими лекарствами, а препаратами растительного происхождения. В связи с этим еще в 2000 году на Международном фармакологическом конгрессе в Мюнхене было провозглашено: будущее фармакологии – натуральные (природные) препараты. Тогда же во всем мире начался настоящий бум препаратов растительного происхождения, в том числе биологически активных добавок – БАД. Подобные препараты эффективны и более безопасны, чем химические соединения, и могут влиять не на следствия болезни, а на ее причины.

Для лечения и профилактики упомянутых выше и других заболеваний, а также в качестве антистрессовых препаратов и адаптогенов используются главным образом растения и препараты растительного происхождения. Фитопрепараты все шире используются и в качестве противовирусных, антибактериальных, а также гормональных, в том числе контрацептивных средств. К примеру, сегодня при лечении сердечно-сосудистых заболеваний и злокачественных опухолей препараты, полученные из растений, составляют более 50%. В развитых странах общее количество лекарственных веществ, получаемых из природных продуктов, составляет более 50% всех лекарств, а в Японии – почти 90%. Возрастающие интереса к лекарственным средствам на основе биологически активных соединений

природного, прежде всего, растительного происхождения обусловлено, как уже отмечалось, также возрастанием алергизации населения, в том числе вследствие использования синтетических медицинских препаратов, которые нередко являются ксенобиотиками.

Преимущества лекарственных препаратов растительного происхождения детально рассмотрены в монографии [2]. Здесь отметим лишь следующее.

В медицине сегодня используется около 300 видов растений, из них приблизительно 100 специально выращивается, а остальные – дикорастущие. При этом большинство ценных лекарственных растений – редкие или исчезающие виды; а к сырью из тропических, субтропических, альпийских и некоторых других видов, преимущественно эндемичных, доступ достаточно ограниченный. Кроме того, резко сократились и продолжают сокращаться ресурсы обычных для центрально- и восточноевропейских стран лекарственных растений, которые в свое время позволяли быть им (в том числе и прежде всего – Украине, европейской части России, Беларуси) ведущими в выращивании и заготовке растительного сырья. Это происходит, с одной стороны, вследствие резкого сокращения территории для сбора дикорастущих трав из-за химического и радиационного загрязнения, а также часто варварских методов заготовки сырья и, с другой – из-за невозможности выращивания многих лекарственных растений в культуре из-за их биологических особенностей или неблагоприятных климатических условий. Именно поэтому дефицитными стали даже ландыш или валериана. Подобная ситуация сложилась и с тропическими и горными растениями в местах их естественного произрастания.

Современным направлениям биологической науки – клеточной биологии и биотехнологии – удалось найти пути решения этой проблемы. Используя методы выращивания клеток, тканей и органов растений в контролируемых условиях на искусственных питательных средах, возможно получать растительную биомассу в неограниченном количестве. Эта биомасса может использоваться (и уже широко используется, о чем ниже) как лекарственное сырье, т.к. является экологически чистой, не загрязненной химическими удобрениями, пестицидами, гербицидами, тяжелыми ме-

таллами, радиоактивными изотопами и т.п. Для получения биомассы, по качественным параметрам близкой, а в некоторых случаях и более качественной по сравнению с сырьем, заготавливаемым в природе, не нужны какие-либо особые почвенно-климатические условия. Выращивать изолированные клетки, ткани или органы возможно в любом месте Земли или даже в Космосе, независимо от вида растения – дальневосточный женьшень, тропическую раувольфию, сибирский элеутерококк, алтайский золотой корень или обычную валериану. Как свидетельствуют уже полученные, в том числе и в производственных условиях, данные, многие клеточные линии являются весьма производительными, например, с одного грамма каллусной ткани женьшеня клеточной линии БЮ-2МК или каллуса раувольфии змеиной штамма К-27 за один год можно получить более 100 тонн (!) биомассы, превышающей по всем качественным параметрам сырье, заготавливаемое в природе (детальнее см. [2]). Таким образом, на сегодня решен главный вопрос – доказана принципиальная возможность получения растительного лекарственного сырья из биомассы культивируемых клеток не только в лабораторных условиях, но и в промышленных масштабах.

Первой в мире промышленной клеточной биотехнологией лекарственных растений стало получение биомассы культуры тканей женьшеня настоящего *Panax ginseng*, начатое на заводах СССР в 1972 г. Промышленный штамм культуры тканей женьшеня БЮ-2 был создан на основе каллуса, полученного Р.Г. Бутенко в 1960 г. Детальное фармакологическое изучение клеточной биомассы женьшеня, проведенное Л.И. Слепян в 1960-х годах в Ленинградском химико-фармацевтическом институте, оптимизация условий выращивания и состава питательной среды, проведенные Н.Ф. Писецкой, разработка технологии крупномасштабного выращивания биомассы, выполненная И.В. Александровой во Всесоюзном НИИ «Биотехника», завершились созданием промышленного регламента, широко внедренного в 70-х годах прошлого века на заводах Главмикробиопрома СССР. В 1991 г. клеточную биомассу женьшеня получали на 15 заводах (в том числе на четырех – в Украине) ежегодно, начиная с 1988 г., в количестве более 2500 кг в пересчете на сухую

биомассу. В эти годы на мировом рынке стоимость сухого корня дикорастущего женьшеня была в пределах 200–300 тыс. долларов США, плантационного – 20–30 тыс. долл., цена 1 кг сухой биомассы культурального женьшеня на внутреннем рынке СССР была примерно 1500 долл. США (в пределах 1300–1500 руб.). Это позволило использовать экстракт клеточной биомассы женьшеня не только для выпуска лекарственного препарата «Биоженьшень» (с 1989 г.), но и, начиная с 1972 г., выпускать широкий спектр косметических и пищевых товаров, в частности, кремов и напитков, с добавками такого экстракта. В конце 80-х годов мы завершили создание нового клеточного штамма женьшеня, БЮ-2МК, который накапливает тритерпеновых гликозидов в несколько раз больше, чем штамм БЮ-2. Штамм БЮ-2МК использовался на нескольких заводах и малых предприятиях Украины как источник растительного сырья для фармакологического и косметического производств в промышленных масштабах [2–4].

С конца 1970-х гг. в СССР, в том числе на двух заводах Украины, внедрена технология получения клеточной биомассы родиолы розовой *Rhodiola rosea*. Эта технология разработана во Всесоюзном НИИ «Биотехнология» на основе клеточного штамма, полученного И.В. Александровой и А.Н. Данилиной, охарактеризованном и паспортизованном в отделе генетики клеточных популяций Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины (В.А. Кунах, А.И. Свидченко). Клеточную биомассу родиолы использовали главным образом в парфюмерном и косметическом производствах [2–4].

В Японии в 1983 г. получена первая промышленная партия чистого вещества – нафтохинонового красителя шиконина из биомассы культивируемых клеток воробейника краснокорневого *Lythospermum erithrorhizon* массой 40 кг для изготовления губной помады высшего качества. Второй в мире технологией получения чистого вещества было производство в Украине с 1987 г. на Харьковском производственном химико-фармацевтическом объединении «Здоровье» алкалоида аймалина, который используется для изготовления противораковых лекарственных препаратов. Эта технология разработана на основе штаммов К-20 и К-27 культуры тканей раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina*, по-

лученных сотрудниками отдела генетики клеточных популяций Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины совместно с Ленинградским химико-фармацевтическим институтом (ныне Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия) [2–5].

Сегодня клеточные биотехнологии лекарственных растений бурно развиваются в разных странах, в промышленных масштабах получают убихинон, антоцианы, алкалоиды, гликозиды и другие биологически активные вещества. Например, по доступным для анализа данным, в Японии еще в 1990 г. получено таких веществ на сумму свыше 90 млн. долл. США, в 1995 г. – более чем на 250 млн. долл. США. Можно сказать, что использование клеточных культур стало рутинной технологией получения многих биологически активных веществ растительного происхождения для использования в медицинской, вкусопищевой, косметической и др. видах промышленности.

На сегодня известно более 100 000 вторичных метаболитов растительного происхождения, в культуру *in vitro* введено подавляющее большинство растений-продуцентов этих веществ. Например, только в серии монографий под общим названием «Biotechnology in Agriculture and Forestry» издательства «Шпрингер» (Springer-Verlag), начиная с 1986 г. подробно описаны особенности культуры тканей лекарственных растений – представителей около 300 родов [6]. Некоторые из таких культур накапливают в 10–30 раз больше целевого продукта, чем природные растения. Известны примеры, когда количество вторичного метаболита в биомассе культивируемых клеток превышает его содержание в растении на два порядка. Например, культивируемые клетки раувольфии змеиной способны накапливать до 20% алкалоида аймалина, что в 80–100 раз больше, чем накапливает кора корня природного растения (см. [2, 5, 7]). При достаточной производительности культуры тканей и цены конечного биотехнологического продукта (аймалина – 1500 долл. США/кг, шиконина – 4000 долл./кг, камптотецина и его производных – 5000–25 000 долл./кг) технологии рентабельны (следует отметить, что цена противоопухолевого алкалоида таксола, который накапливается некоторыми древесными растениями рода тис *Taxus*, превышает 200 000 долл./кг). Культуры таких клеток

выращивают в промышленных масштабах, а полученное сырье используют для производства лекарственных препаратов. Сейчас, разрабатывая новый фитопрепарат или препарат на основе природных соединений растительного происхождения, как источник сырья указывают одновременно на интактные растения и на клеточную биомассу, выращенную *in vitro*.

Несмотря на ряд преимуществ, есть много причин, сдерживающих промышленное производство биологически активных веществ растительного происхождения в биореакторах. Основными среди них, по нашему мнению, являются:

- практически в большинстве описанных случаев органы, ткани или клетки, продуцирующие в живом растении соответствующие вещества, при введении в культуру *in vitro* вследствие, прежде всего, их дедифференцирования не синтезируют эти вещества или синтезируют их в незначительных количествах. Требуется длительная селекционная работа на клеточном уровне, а также разработка оптимальных условий выращивания для того, чтобы культура изолированных клеток или тканей смогла достичь оптимального уровня производства биологически активных веществ;
- по сравнению с микроорганизмами растительные клетки растут гораздо медленнее. Для удвоения количества растительных клеток в культуре *in vitro* в среднем требуется в 20 раз больше времени, чем для удвоения количества клеток микроорганизмов. В результате, производство в больших масштабах осложняется вследствие того, что следует придерживаться специальных мер для предотвращения инфекции при длительном процессе производства;
- для промышленного производства нужны клеточные культуры, характеризующиеся высокой стабильностью продукции, однако у многих клеточных культур при производстве проявляется нестабильность. Часто способность отселектированных линий клеток вырабатывать целевой продукт в необходимом количестве уменьшается после нескольких субкультивирований. Механизмы, способствующие стабильному протеканию процессов вторичного метаболизма (накопления веществ специализированного обмена), разнообразны и все еще изучаются;

- суспензионные культуры растений состоят, в основном, из агрегатов клеток различного размера. Это означает, что клетки на поверхности агрегата и в его центре не идентичны, что затрудняет оптимизацию процесса производства целевого продукта. Установлено, что во время образования агрегатов различного размера между клетками возникают морфологические различия, которые в условиях массового производства усугубляются еще больше и вызывают высокую гетерогенность культуры и усложняют культивирование в ферментерах (биореакторах). Кроме того, некоторые культуры клеток превращают внеклеточную сахарозу в полисахариды, которые увеличивают агрегирование клеток;
- производство соответствующего вторичного продукта в нужном количестве часто связано с индукцией органогенеза в клеточной культуре. Например, у женьшеня получены клоны, имеющие высокое содержание гликозидов при переходе к ризогенезу, а у мака только в органогенных культурах происходит биосинтез морфиновых алкалоидов (см., например, [2, 8, 9]). Это создает немало трудностей в условиях массового культивирования;
- вещества специализированного обмена, или вторичные продукты, большинством растительных культур не выделяются в среду, а остаются внутри клеток. Например, это свойственно культурам, синтезирующим алкалоиды (раувольфия змеиная), что усложняет экстрагирование целевого продукта. Часто методы экстрагирования из клеточной биомассы и очистки конечного продукта отличаются от методов, применяемых для растительного сырья, заготавливаемого в природе;
- вследствие крупных размеров, высокой степени обводнения и сравнительно хрупких клеточных стенок культивируемые клетки растений чувствительны к перемешиванию и снабжению кислородом. Все это требует конструирования специальных ферментеров (биореакторов).

Для повышения производительности культивируемых клеток широко и во многих случаях успешно применяют:

- клеточную селекцию, основанную как на спонтанной, так и на индуцированной раз-

личными мутагенами изменчивости культивируемых клеток;

- оптимизацию условий выращивания и состава ростовых и продукционных питательных сред;
- культивирование дифференцированных тканей или органов или индукцию дифференцировки при выращивании на продукционных питательных средах;
- использование элиситоров [2, 3, 5, 7–10].

В последнее время с этой целью применяются методы клеточной и генетической инженерии. Самым распространенным является трансформация клеток с помощью бактерии *Agrobacterium rhizogenes* и получение так называемых «бородатых корней» (hairy roots), производительность которых в ряде случаев значительно выше, чем обычных недифференцированных культур. Повышают синтез вторичных метаболитов также усиливая активность соответствующего фермента. Это возможно:

- путем введения гетерологичного гена с той же функцией от микроорганизмов или других видов растений;
- подстановкой собственного гена под более сильный промотор;
- введением гена, кодирующего ферменты, нечувствительные к ретроингибированию, или гена, кодирующего антитела против энзима, являющегося конкурентом за тот же субстрат, что и желаемый ген;
- снижением уровня катаболизма целевых вторичных соединений.

Задачами будущих исследований, способных превратить биотехнологию растений, в частности, лекарственных, на рутинную промышленную технологию, по нашему мнению, являются:

- углубленное изучение генетики вторичного метаболизма;
- выделение и клонирование соответствующих генов (как структурных, так и регуляторных), что позволит создавать высокопроизводительные клеточные штаммы и трансгенные растения с применением современных методов генетической инженерии (метаболическая инженерия биосинтеза вторичных метаболитов);
- дальнейшее совершенствование промышленных технологий выращивания изолированных органов, тканей и клеток растений путем их упрощения;
- удешевления технологического оборудова-

ния биотехнологических производств.

За время изучения биосинтеза вторичных метаболитов в культуре клеток растений накоплен большой объем информации, который свидетельствует о существовании следующих закономерностей:

- культивируемые клетки способны к синтезу практически всех классов соединений вторичного (специализированного) обмена (алкалоиды, стероиды, терпеноиды и др.);
- первичные культуры клеток часто содержат незначительное количество соединений специализированного обмена или не содержат их вовсе; однако содержание этих соединений можно значительно повысить путем оптимизации состава питательной среды и подбора условий выращивания, методами клеточной селекции, искусственного мутагенеза и др.;
- синтез некоторых конкретных соединений (димерных индольных и морфиновых алкалоидов, карденолидов и некоторых других) в дедифференцированных культивируемых клетках практически не происходит; при этом выявляется четкая тенденция: чем сложнее строение вещества и больше специфических этапов его синтеза (после «ответвления» от первичного метаболизма), тем менее вероятен синтез этого соединения в клеточной культуре;
- синтез вторичных соединений, как правило, улучшается в случае замедления или приостановки роста клеточной культуры;
- во многих случаях синтез вторичных соединений начинается только в случае появления в клеточной культуре дифференцированных (морфогенных) структур;
- стабильность синтеза вторичных соединений неодинакова для разных классов веществ и для различных клеточных культур: синтез стероидных гликозидов, как правило, стабилен, тогда как синтез многих типов алкалоидов нестабилен (за исключением, например, индолиновых алкалоидов в полученных нами клеточных штаммах раувольфии змеиной, см. [2, 5, 7, 10, 11]);
- для метаболизма вторичных соединений в культуре клеток растений часто свойственны регрессивные изменения как в онтогенетическом, так и в филогенетическом направлении; т.е. специализированный обмен в культуре имеет признаки филогенетически архаичных

групп растений или ювенильной стадии интактного растения; например, в культивируемых клетках мака прицветникового *Papaver bracteatum* (многолетнее растение) есть в наличии сангвинарин, но отсутствует тебаин (последний характерен для взрослого растения, сангвинарин же отсутствует в сформировавшемся растении и проявляется в листьях растения только на первом году его жизни [8, 9]); в культуре клеток живокости найдены Δ^7 -стерины, отсутствующие в интактном растении, но характерные для филогенетически более ранних групп растений (более детально информация изложена в работах [2, 8, 9, 12]).

С учетом этих закономерностей создаются клеточные штаммы путем получения адекватного генотипа (генофонда) клеточных популяций, способных к высокоэффективному синтезу желаемых соединений и полной реализации этой способности. Технология создания высокопродуктивных штаммов и разработки оптимальных условий их выращивания включает следующие этапы:

- подбор вида растения-донора: различные виды растений имеют неодинаковую способность к синтезу в культуре клеток целевого вещества, например, разные виды мака в культуре *in vitro* имеют неодинаковую потенциальную способность к синтезу целевых алкалоидов;
- подбор конкретного высокопроизводительного растения-донора для получения клеточной культуры (исходного генотипа);
- генетические манипуляции с культурой тканей, включая получение мутантов, соматических клонов и другие подходы клеточной селекции, направленные на получение генетически измененных высокопроизводительных штаммов (клеточных популяций с измененным генофондом);
- разработку состава питательной среды, условий и способов выращивания, оптимальных для стабильной реализации генетически обусловленной способности к синтезу целевых веществ;
- влияние на рост (пролиферацию) клеток в культуре с целью приостановления или замедления роста, что может изменять метаболизм клеток в направлении синтеза веществ специализированного обмена: например, успешно применяют с этой целью ингибиторы транскрипции и трансляции;

- поиск сигналов, с помощью которых в растениях происходит управление синтезом вторичных метаболитов в клетках (элиситоров, неспецифических стрессовых факторов и т.д.) и использование их для повышения выхода целевого продукта в клеточных культурах;
- получение органогенных культур, например, культуры корней, в том числе и трансформированных культур, в частности «бородатых корней» (hair roots), что во многих случаях упрощает условия культивирования и повышает содержание целевых вторичных метаболитов;
- получение трансгенных культур (как клеточных и тканевых, так и целостных растений) с целью синтеза целевого продукта, например, животного происхождения, вакцин, специфических белков человека и т.п. (молекулярное фермерство) (детальнее см., например, [2, 4, 12–14]).

Таким образом, на сегодня накоплено большое количество данных, свидетельствующих о том, что в культуре тканей возможен синтез любых известных веществ не только растительного, но и животного и даже человеческого происхождения. Клеточные технологии получения фитопрепаратов, начиная с 1980-х годов, все шире и все более успешно используются в промышленном производстве. Изучение возможностей вовлечения в такое производство все большего числа видов растений с целью расширения арсенала получаемых ценных соединений возрастает. В частности, только в серии монографий «Биотехнология в сельском хозяйстве и лесоводстве» (Biotechnology in Agriculture and Forestry, Springer), из вышедших с 1986 г. 64 томов 18 посвящены лекарственным и ароматическим растениям. В этих томах описаны конкретные результаты биотехнологических исследований с лекарственными растениями различных видов, относящихся к почти 300 родам растений из различных семейств. А некоторым лекарственным растениям посвящены отдельные выпуски, в которых детально рассмотрены различные аспекты их биотехнологий, как клеточных так и генных [6].

«Здоровье – это состояние полного физического, психологического и социального благополучия, а не только отсутствие болезней или физических недостатков» – определение Всемирной организации здравоохранения, предложенное в свое время философом Сигерестом. Данное

классическое определение здоровья имеет в виду и благоприятные условия проживания, и полноценное питание, и адекватное лечение. Сегодня для улучшения условий проживания, питания, профилактики и лечения заболеваний широко используются современные методы биотехнологии. В ближайшем будущем едва ли не единственным источником экологически чистого и качественного растительного сырья для пищевой, фармакологической, косметической и даже перерабатывающей, текстильной, строительной и др. промышленности могут быть только растительные биотехнологии. По крупному счету, биотехнологи готовы решать эти проблемы.

Таким образом, создание благоприятных условий проживания, полноценного питания, адек-

ватного лечения, профилактики и коррекции стрессов, старения и тесно связанных со старением возрастных болезней, в основе которых лежит, прежде всего, использование природных соединений преимущественно растительного происхождения при соответствующем их использовании могут способствовать приближению к максимально возможной длительности жизни настолько, чтобы ее средняя длительность в 90–100 и даже 110–115 лет стала реальностью. И эти преклонные годы не должны быть убогим старческим существованием, а, напротив, стать полноценными, продуктивными и не лишеными радостей жизни. Именно на это была и будет направлена биотехнология в целом и биотехнология лекарственных растений в частности.

Список использованной литературы

1. Тодоров, И.Н. Стресс, старение и их биохимическая коррекция / И.Н. Тодоров, Г.И. Тодоров. – М.: Наука, 2003. – 479 с.
2. Кунах, В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ: Логос, 2005. – 730 с.
3. Продуктивность и генетическая структура клеточных популяций женьшеня *Panax ginseng* С.А.Меу в культуре *in vitro* / В.А. Кунах [и др.] // Биотехнология. – 2003. – № 3. – С. 25–35.
4. Кунах, В.А. Біотехнологія рослин для поліпшення умов життя людини // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1, № 1. – С. 101–106.
5. Kunakh, V.A. Twenty five years long stable biosynthesis of ajmaline by related hormone-independent *Rauwolfia serpentina* cell lines // *Euro-medica – Hannover – 2005, Hannover, 16–17 Juni 2005, International Congress and Exhibition, Programm. – Abstracts, P.22.*
6. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. – Berlin etc.: Springer, 1986–2012. – V. 1–64.*
7. Kunakh, V.A. Somaclonal variation in *Rauwolfia* // *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Somaclonal Variation in Crop Improvement II. Ed. Y.P.S. Bajaj. – Berlin etc.: Springer, 1996. – V.36. – P. 315–332.*
8. Кунах, В.А. Биосинтез изохинолиновых алкалоидов мака в природе и в культуре *in vitro*. 1. Мак снотворный, *Paraver somniferum* L. / В.А. Кунах, В.А. Кацан // Украинский биохимический журнал. – 2003. – Т. 75, № 5. – С. 41–54.
9. Кунах, В.А. Биосинтез изохинолиновых алкалоидов мака в природе и в культуре *in vitro*. 1. Мак прицветниковый, *Paraver bracteatum* Lindl. / В.А. Кунах, В.А. Кацан // Украинский биохимический журнал. – 2004. – Т. 76, № 5. – С. 29–44.
10. Кунах, В.А. Особенности получения и продуктивность суспензионных культур и клеточных клонов *Rauwolfia serpentina* Benth. *in vitro* / В.А. Кунах, Л.П. Можилевская, С.И. Губарь // Биотехнология. – 2001. – № 4. – С. 9–21.
11. Стабильность генома высокопродуктивных клеточных линий раувольфии змеиной при длительном выращивании *in vitro* / И.О. Андреев [и др.] // Доповіді НАН України. – 2007. – № 10. – С. 147–152.
12. Носов, А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений. // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 5–20.
13. Кучук, Н.В. Способы получения рекомбинантных фармацевтических белков в растениях // Вісник Українського тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2003. – Т. 1. – С. 55–61.
14. Кунах, В.А. Еволюція геному рослин в культурі клітин *in vitro*: особливості, причини, механізми та наслідки // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – Київ: Логос, 2001. – Т. 1 – С. 53–67.

Дата поступления статьи 6 ноября 2012 г.

А.И. Шапошников¹, Т.С. Азарова¹, Л.В. Кравченко¹, А.А. Бажанова², Д.П. Бажанов², О.Г. Бабак²,
Н.А. Некрашевич², А.В. Кильчевский²

КОРНЕВЫЕ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.), ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ОТЗЫВЧИВОСТЬЮ НА БАКТЕРИЗАЦИЮ

¹ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,
Россия, 196608, г. Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3
²ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Корневые выделения высших растений являются неотъемлемой частью ризосферы – зоны, где создаются благоприятные условия для развития микроорганизмов [1]. Низкомолекулярные органические вещества, которые в процессе жизнедеятельности растения постоянно поступают в ризосферу, выполняют как трофическую функцию, так и являются источником физиологически активных веществ [2]. Роль корневых экзометаболитов в развитии и функционировании микробных сообществ почвы особо следует учитывать при интродукции в ризосферу бактерий – продуцентов биопрепаратов для защиты и стимуляции роста растений.

Применение бактериальных биопрепаратов, получивших широкое распространение в сельском хозяйстве, к сожалению, не всегда дает стабильные положительные результаты. В связи с этим чрезвычайно актуальными являются исследования, направленные на селекцию генотипов растений, наиболее отзывчивых на интродукцию полезных микроорганизмов [3], а также изучение генетических и биохимических механизмов, приводящих к формированию продуктивных растительно-микробных ассоциаций. Так, в литературе известны данные о хромосомном контроле формирования азотфиксирующей ассоциации у замещенных линий пшеницы при инокуляции двумя видами

дiazотрофов [4]. При изучении влияния корневых экзометаболитов пшеницы с различной плоидностью генома на рост *Azospirillum brasilense* показано, что повышенная численность бактерий в ризосфере диплоидных генотипов связана с преобладанием в составе корневых выделений органических кислот [5]. Именно органические кислоты являются наилучшим источником углерода для быстрого развития азоспирилл. В работе по изучению влияния ряда бактериальных штаммов на рост редиса и томата, показано, что положительное влияние бактерий связано с продукцией индолилуксусной кислоты, которая синтезируется бактериями в ризосфере при потреблении триптофана [6]. Успешное применения биоконтрольного штамма *Pseudomonas fluorescens* WCS365 в ризосфере томата сорта Кармелло связано с повышенной способностью колонизировать корни, причем конкурентная способность WCS365 в ризосфере определялась способностью утилизировать органические кислоты, являющиеся доминирующей фракцией корневых выделений данного сорта томата [7].

Цель настоящей работы – изучение взаимосвязи состава корневых выделений различных генотипов томата и отзывчивости растений на инокуляцию ростстимулирующими ризобактериями.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали образцы томата *Solanum lycopersicum* L. Зорка, Калинка, Линия 7, Линия 164. Методология полевого опыта заключалась в экспериментальных исследованиях ото-

бранных генотипов томата в двух вариантах: 1) обработка штаммом ризосферной бактерии *Burkholderia* sp.418 (В 418); 2) контроль – без обработки (К). В контроле обработку проводили средой для выращивания бактерий, разве-

денной в 0,1М MgSO₄. Инокуляцию проводили погружением семян в суспензию бактерий в 0,1М MgSO₄ (титр около 10⁸) на 15 минут. После инокуляции для удаления излишка влаги семена помещали на фильтровальную бумагу. Обработанные семена раскладывали в ящики для посева.

Для анализа состава корневых выделений семена стерилизовали в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 3-х минут, затем многократно промывали в стерильной воде общим объемом 0,5 л. Контроль стерильности проводили, выкладывая контрольную партию семян в чашки Петри на богатую агаризованную питательную среду. Растения выращивали в условиях фитотрона при 21 °С с 16-часовым периодом освещения (10 000 люкс) [8].

Молекулярный состав органических кислот, углеводов и аминокислот определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для анализов корневых экссудатов использовали ВЭЖХ систему JASCO LC-900 (Jasco International CO., LTD, Япония). Органические кислоты разделяли на

ионообменной хроматографической колонке SUPELCOGEL C-610H (Supelco Gland, Швейцария). В качестве подвижной фазы применяли раствор 10,0 мМ Н₃Р₀₄, длина волны ультрафиолетового детектора составляла 220 нм. Детектирование редуцирующих сахаров осуществляли методом послеколонной реакции. В качестве окрашиваемого реактива использовали раствор 2,3,5-трифенил-тетразолия хлорида. Сахара разделяли на хроматографической колонке SUPELCOSIL LC-NH₂ (Supelco Gland, Швейцария). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил/вода (85/15 об/об). Поглощение окрашенного комплекса измеряли при длине волны 487 нм. Молекулярный состав аминокислот определяли высокочувствительным методом AccQ-Tag (Waters, США), который основан на анализе специфичных флуоресцирующих производных аминокислот.

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности, в таблицах даны средние арифметические величины. Величина ошибок измерений представлена стандартным отклонением.

Результаты и обсуждение

Результаты полевых экспериментов 2007–2010 гг. выявили сортовую специфику по отзывчивости томата на обработку штаммом ризосферной бактерии *Burkholderia* sp.418 по ряду признаков [9]. Показана возможность использования отношения значения признака в варианте с обработками микроорганизмами к контролю для определения степени эффективности растительно-микробного взаимодействия. Кроме того, выявлена возможность оценки эффективности такого взаимодействия и отбора отзывчивых форм на ранних стадиях развития по признаку «высота сеянцев».

Оценку влияния инокуляции семян томата бактериальным штаммом на высоту сеянцев проводили в день пикировки. Несмотря на достаточно сильное влияние факторов окружающей среды на устойчивость и эффективность ассоциации «растение-штамм», отмечена различная реакция изучаемых генотипов томата на бактериализацию (табл. 1).

Сорт Зорка охарактеризовал себя как генотип, отзывчивый на инокуляцию семян штаммом *Burkholderia* sp.418. В течение трех лет образец Зорка показывал достоверное увеличение

признака «высота сеянцев» при бактериализации и только в последний год наблюдения это значение признака «высота сеянцев» было близким к контрольному. Линия 7, как правило, отрицательно реагировала на обработку изучаемым штаммом. Однако, в 2009 году достоверной разницы по признаку «высота сеянцев» между контрольным и вариантом с бактериализацией не обнаружено. Наиболее подверженными влиянию условий окружающей среды оказались растительно-микробные ассоциации с участием образцов Линия 164 и Калинка, реакция на бактериализацию по признаку «высота сеянцев» у которых менялась в зависимости от года исследования.

У генотипов томата, различавшихся по отзывчивости на обработку ростстимулирующим штаммом *Burkholderia* sp. 418, наблюдались различия в качественном составе и интенсивности выделения основных углеродных соединений, являющихся питательными субстратами для ризосферных микроорганизмов. В результате хроматографического анализа корневых выделений изучаемых образцов томата было обнаружено девять органических кислот (табл. 2). В наибольшем количестве корнями образцов

Зорка, Линия 164 и Калинка выделялась молочная кислота, тогда как в корневых выделениях формы Линия 7 доминировали фумаровая, молочная и лимонная кислоты. При этом лимонная кислота присутствовала только у образцов Линия 7 и Линия 164 и ее количество составляло соответственно 19,5% и 13,1% от общего количества выделяемых органических кислот.

У форм Зорка и Линия 7 не обнаружено янтарной кислоты, тогда как ее содержание во фракции органических кислот у образцов Линия 164 и Калинка составляло в среднем около 6%. Суммарно больше всего органических кислот в среднем выделяли корни сорта Зорка, а у остальных исследуемых форм данный показатель был в 1,7–3,1 раза ниже.

Таблица 1

Изменение высоты сеянцев образцов томата при взаимодействии со штаммом *Burkholderia* sp.418, 2007–2010 гг.

Генотипы	Высота сеянцев	2007	2008	2009	2010	Среднее значение
Калинка	К*, мм	81,3 ± 4,8	65,1 ± 2,8	41,5 ± 3,8	45,9 ± 6,5	58,5
	В 418, мм	71,4 ± 3,3	50,2 ± 2,7	73,0 ± 3,6	47,6 ± 4,0	60,6
	% к контролю	87,8	77,1	175,8	103,6	111,1
Зорка	К*, мм	61,3 ± 5,5	57,4 ± 3,0	45,8 ± 2,7	43,4 ± 4,9	52,0
	В 418, мм	68,8 ± 4,9	65,2 ± 1,8	60,6 ± 4,1	42,5 ± 4,8	59,3
	% к контролю	112,2	113,6	132,1	98,1	114,0
Линия 164	К*, мм	56,2 ± 8,0	59,6 ± 2,3	65,5 ± 2,0	52,2 ± 2,3	58,4
	В 418, мм	94,2 ± 7,9	56,4 ± 3,7	76,9 ± 4,2	49,2 ± 2,4	69,2
	% к контролю	167,6	94,6	117,4	94,2	118,5
Линия 7	К*, мм	77,5 ± 4,1	63,2 ± 2,2	56,1 ± 2,6	63,0 ± 2,7	65,0
	В 418, мм	66,9 ± 4,4	53,8 ± 2,6	58,8 ± 3,5	50,9 ± 3,6	57,6
	% к контролю	86,2	85,1	104,8	80,9	89,3

* – контроль; В 418 – *Burkholderia* sp.418

Таблица 2

Органические кислоты в корневых выделениях, мкг/растение

Органическая кислота	Калинка	Зорка	Линия 164	Линия 7
Кетоглутаровая	0,44 ± 0,23	0,32 ± 0,17	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,04
Лимонная	–	–	0,63 ± 0,27	0,72 ± 0,48
Пировиноградная	0,39 ± 0,13	0,26 ± 0,09	0,21 ± 0,06	0,23 ± 0,04
Аконитовая	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Янтарная	0,17 ± 0,09	–	0,28 ± 0,15	–
Молочная	1,52 ± 0,96	7,33 ± 3,90	3,49 ± 1,66	1,31 ± 0,81
Фумаровая	0,01 ± 0,001	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,006	1,35 ± 0,63
Пироглутамовая	0,04 ± 0,03	0,07 ± 0,04	0,13 ± 0,10	0,01 ± 0,01
Сумма	2,60 ± 1,37	8,02 ± 3,31	4,80 ± 1,44	3,69 ± 1,92

В корневых выделениях исследуемых форм томата присутствовали семь сахаров (табл. 3). Основную часть фракции сахаров во всех вариантах составляли фруктоза, глюкоза и мальтоза, а у образца Линия 7 также мелибиоза, отсутствовавшая у других форм. Максимальное

количество фруктозы в среднем выделяли корни сорта Зорка, глюкозы и мальтозы – образца Линия 7. Суммарное выделение сахаров было наибольшим у форм Зорка и Линия 7, тогда как генотипы Линия 164 и Калинка выделяли сахаров в 3–3,5 раза меньше.

Таблица 3

Сахара в корневых выделениях, мкг/растение

Сахар	Калинка	Зорка	Линия 164	Линия 7
Рибоза	0,05 ± 0,03	0,11 ± 0,06	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,01
Ксилоза	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,07
Арабиноза	0,05 ± 0,03	0,03 ± 0,02	–	0,03 ± 0,02
Фруктоза	1,30 ± 0,85	4,25 ± 2,12	1,21 ± 0,37	1,86 ± 0,70
Глюкоза	0,38 ± 0,04	2,81 ± 1,95	0,37 ± 0,05	3,72 ± 2,48
Мальтоза	0,35 ± 0,18	0,39 ± 0,14	0,57 ± 0,23	0,94 ± 0,67
Мелибиоза	–	–	–	0,50 ± 0,30
Сумма	2,16 ± 1,11	7,63 ± 3,92	2,31 ± 0,68	7,22 ± 4,07

Качественный состав аминокислот был идентичен у всех исследуемых генотипов томата (табл. 4). Суммарная доля аспарагиновой и глутаминовой кислот составляла от 43% (Линия 7) до 56.9% (Линия 164), от общего количества выделяемых аминокислот. Образцы томата значительно различались по содержанию пролина и L-триптофана. Количество пролина в корневых выделениях сорта Зорка было в 6,5 раза выше, чем у образца

Линия 164 и 18 раз выше, чем в выделениях сорта Калинка. Сорт Калинка выделял в 31,7 раза, а образец Линия 164 – в 11,5 раз меньше пролина, чем образец Линия 7. Наименьшее содержание L-триптофана отмечено у сорта Калинка, наибольшее – у сорта Зорка и образца Линия 7. Максимальное количество аминокислот наблюдалось в корневых выделениях сорта Зорка и образца Линия 7, наименьшее – у образца Линия 164.

Таблица 4

Аминокислоты в корневых выделениях, нг/растение

Аминокислота	Калинка	Зорка	Линия 164	Линия 7
Аспарагиновая	254,9 ± 74,4	276,5 ± 110,2	128,9 ± 68,3	204,8 ± 101,2
Серин	105,6 ± 53,2	75,4 ± 38,7	14,6 ± 8,2	64,9 ± 26,3
Глутаминовая	239,8 ± 79,1	515,7 ± 212,4	137,7 ± 74,8	393,5 ± 233,3
Глицин	19,9 ± 6,9	41,9 ± 28,1	14,6 ± 8,4	20,1 ± 6,2
Гистидин	78,4 ± 43,0	13,6 ± 9,2	6,2 ± 3,9	11,3 ± 7,1
Аргинин	34,7 ± 19,3	43,6 ± 26,2	19,2 ± 10,0	68,8 ± 35,8
Треонин	25,6 ± 21,0	40,8 ± 19,6	10,3 ± 4,7	36,3 ± 19,4
Аланин	12,5 ± 1,3	49,8 ± 24,3	17,1 ± 9,4	42,8 ± 21,5
Пролин	1,2 ± 1,2	21,6 ± 12,9	3,3 ± 2,1	38,0 ± 23,1
Тирозин	12,7 ± 5,1	47,6 ± 27,1	8,3 ± 5,9	14,1 ± 7,2
Валин	48,6 ± 17,4	164,1 ± 79,2	33,1 ± 15,8	141,7 ± 68,5
Метионин	9,0 ± 7,2	2,6 ± 1,9	1,1 ± 0,8	1,1 ± 0,7
Лизин	43,8 ± 9,3	55,0 ± 30,0	13,2 ± 8,6	42,2 ± 27,4
Изолейцин	19,1 ± 11,0	146,8 ± 76,5	14,6 ± 8,9	81,0 ± 45,2
Лейцин	84,0 ± 76,1	161,0 ± 85,4	29,5 ± 11,8	132,7 ± 81,0
Фенилаланин	17,4 ± 10,5	75,6 ± 40,2	10,1 ± 5,6	70,4 ± 41,0
Триптофан	0,4 ± 0,2	25,8 ± 15,3	6,7 ± 3,9	23,6 ± 16,8
Сумма	1007,3 ± 538,3	1757,2 ± 842,3	468,4 ± 222,1	1387,0 ± 778,5

Данные анализа корневых экссудатов были получены на ранних сроках культивирования растений, в период формирования микробного комплекса ризосферы, когда интродуцированные бактерии при благоприятных условиях могут оказывать существенное влияние на рост и развитие растений. Анализ суммарных значений трех энергетически ценных фракций корневых выделений исследуемых генотипов томата позволил предположить, что наибольшая отзывчивость на бактеризацию сорта Зорка связана с повышенной интен-

сивностью выделения органических кислот и наиболее высоким средним значением суммарной экссудации (табл. 5). Ранее проведенные исследования (2007–2010 гг.) показали высокий уровень отзывчивости сорта Зорка на обработку ризосферным штаммом *Burkholderia sp.* 418. На ранних стадиях в момент пикировки высота сеянцев в варианте с бактеризацией составляла 112–132% по отношению к контрольному варианту в 2007–2009 годах, только в 2010 г. значение признака было на уровне контроля

Таблица 5

Суммарное количество корневых выделений, мкг/растение

Компонент корневых выделений	Калинка	Зорка	Линия 164	Линия 7
Органические кислоты	2,60 ± 1,37	8,02 ± 3,31	4,80 ± 1,44	3,69 ± 1,92
Сахара	2,16 ± 1,11	7,63 ± 3,92	2,31 ± 0,68	7,22 ± 4,07
Аминокислоты	1,01 ± 0,54	1,76 ± 0,84	0,47 ± 0,22	1,39 ± 0,78
Сумма	5,77 ± 3,00	17,41 ± 7,32	7,58 ± 2,25	12,30 ± 5,95

Следует отметить, что в отдельные годы высота сеянцев образцов Линия 164 и Калинка превышала контроль на 68–78%, в то время как результаты экспериментов по определению корневых экссудатов показали более низкий уровень корневой экссудации (в среднем в 2,3 и 3,0 раза), чем у сорта Зорка. Повышенная экссудация молочной кислоты корнями отзывчивых генотипов Зорка и Линия 164 (табл. 2) позволяет предположить о существенном ее влиянии на эффективность взаимодействия растений томата с ризосферным штаммом *Burkholderia sp.* 418. Значения признаков, по которым учитывали степень отзывчивости

томатов на бактеризацию в полевых исследованиях, значительно варьировали по годам наблюдения, хотя в среднем различия по степени отзывчивости проявились достаточно четко. Отмечена высокая степень варибельности и при количественном анализе индивидуальных компонентов корневых экссудатов, не смотря на проведение экспериментов по культивированию растений в одинаковых контролируемых условиях. Возможно, варибельность интенсивности корневой экссудации может влиять на степень реакции растений при интродукции ростостимулирующих ризобактерий.

Заключение

Таким образом, проведенный анализ взаимодействия различных образцов томата с ризосферным штаммом *Burkholderia sp.* 418 позволил выявить контрастные по отзывчивости на интродукцию бактерий генотипы. Исследование состава и интенсивности экссудации органических кислот, сахаров и аминокислот у изучаемых сортов и линий томата показало характерные отличия корневой экссудации у положительно отзывчивых форм и неотзыв-

чивых. У отзывчивых на бактеризацию образцов (Зорка, Линия 164) отмечена повышенная экссудация органических кислот, особенно молочной кислоты. Кроме того, в корневых выделениях сорта Зорка наблюдалось высокое содержание фруктозы (4,25 мкг/растение). Максимальное суммарное количество аминокислот отмечено в корневых экссудатах сорта Зорка и образца Линия 7, наименьшее – образца Линия 164.

Список использованной литературы

1. Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // *Annual Review of Plant Biology*. – 2006. – V. 57. – P. 233–266.
2. Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M. Root exudation and rhizosphere biology // *Plant physiol.* – 2003. – V. 132. – P. 44–51.
3. Rengel, Z. Genetic Control of Root Exudation // *Plant and Soil*. – 2002. – V. 245. – P. 59–70.
4. Rennie, R.J., Larson, R.I. Dinitrogen fixation associated with disomic chromosome substitution lines of spring wheat // *Can. J. Bot.* – 1979. – V. 57. – P. 2771–2775.
5. Кравченко, Л.В., Азарова, Т.С., Достанко, О.Ю. Влияние корневых экзометаболитов пшеницы с различной ploидностью генома на рост *Azospirillum brasilense* // *Микробиология*. – 1993. – Т. 62, № 5. – С. 863–868.
6. Кравченко, Л.В., Азарова, Т.С., Макарова, Н.М., Тихонович, И.А. Роль триптофана в корневых экзометаболитах для фитостимулирующей активности ризобактерий // *Микробиология*. – 2004. – Т. 73, № 2. – С. 195–198.75. – № 1. – P. 146–148.
7. Lugtenberg, B.J.J., Dekkers, L., Bloembergen, G.V. Molecular Determinants of the Rhizosphere Colonization by *Pseudomonas* // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2001. – V. 39. – P. 461–490.
8. Кравченко, Л.В., Азарова, Т.С., Леонова-Ерко, Е.И., Шапошников, А.И., Макарова, Н.М., Тихонович, И.А. Корневые выделения томатов и их влияние на рост и антифунгальную активность штаммов *Pseudomonas* // *Микробиология*. – 2003. – Т. 72, № 1. – С. 48–53.
9. Кильчевский, А.В., Некрашевич, Н.А., Бабак, О.Г., Бажанов, Д.П., Бажанова, А.А. Анализ эффективности взаимодействия коллекционных образцов томата со штаммом ризосферной бактерии *Burkholderia* sp.418 / *Плодоовощеводство и декоративное садоводство. Состояние и перспективы развития: Материалы междунар. научно-практич. конференции, посвящ. 90-летию кафедры плодовоощеводства и 170-летию Белорусской государственной сельскохозяйственной академии*. – Горки: Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, 2011. – С. 105–109.

Дата поступления статьи 7 декабря 2012 г.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СОМАТРОПИНОВОЙ ОСИ (*pGH, pIGF-2, pIGF-1, pIGF-1R*) У СВИНЬИ ДОМАШНЕЙ (*SUS SCROFA DOMESTICUS*)

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

Введение

Каждый живой организм уникален, и его уникальность отражена в генетическом коде, носителем которого являются гены. Явление существования в популяции полиморфных локусов получило название генетического полиморфизма. Масштабы полиморфизма ДНК таковы, что между последовательностями ДНК двух особей существуют миллионы различий, которые и обуславливают их индивидуальные различия [1].

В основе полиморфизма ДНК лежат вставки, делеции и изменение числа tandemных повторов. Также причиной различий (полиморфизма) генов являются изменения отдельных нуклеотидов в молекуле ДНК, что приводит к изменению свойств гена. Функциональная значимость полиморфизмов связана с тем, что они расположены в кодирующих (экзоны, гены микроРНК и некоторые интроны, содержащие в себе гены микроРНК) и регуляторных (промоторы, энхансеры, инсуляторы) регионах ДНК. Вариации, затрагивающие кодирующие фрагменты генов и отражающиеся на аминокислотной последовательности их продуктов, встречаются относительно редко. Поэтому именно эти, наименее представленные типы полиморфизмов, являются предметом ассоциативных исследований генетиков [2, 3].

Одним из приоритетных направлений научнотехнической деятельности в Республике Беларусь является получение особей животных, обладающих повышенной продуктивностью, и исследование генетических, физиологических и биохимических механизмов формирования продуктивности. С этой целью в мировой прак-

тике животноводства интенсивно внедряются методы маркер-сопутствующей селекции (MAS-селекции), которая является одним из современных направлений, сочетающих информацию о молекулярно-генетических полиморфизмах или маркерных генах (marker loci) с данными об их фенотипическом проявлении. Поиск потенциальных генов-кандидатов активно ведется среди генов, белковые продукты которых отвечают за проявление количественных признаков [4].

Известно, что на ростовые процессы организма влияет комплекс эндокринных, аутокринных и паратипических факторов. Наиболее важную роль в этих процессах играет гормон роста (GH – соматотропин). Регуляция синтеза гормона роста представляет собой многоуровневый каскад взаимодействий белок-рецепторов, тесно связанных между собой. Изменение, нарушение, и тем более выпадение любого из звеньев влечет за собой изменения в работе данной системы, которые могут привести к различиям в фенотипических проявлениях количественных признаков продуктивности у сельскохозяйственных животных.

Современная эффективная селекционно-племенная работа в свиноводстве требует проведения исследований, направленных на выявление полиморфизма потенциальных ДНК-маркеров у свиней различных пород в Республике Беларусь.

Цель данной работы заключалась в изучении полиморфизма генов гормонального ряда соматропиновой оси *pGH/MspI*, *pIGF-1/HhaI*, *pIGF-1R/SacII*, *pIGF-2/NciI*.

Материалы и методы

Исследован полиморфизм генов пролактинового рецептора *pGH/MspI*, *pIGF-1/HhaI*, *pIGF-1R/SacII*, *pIGF-2/NciI*, в выборке популяции ($n = 134$) хряков и свиноматок пород ландрас и йоркшир, белорусская крупная бе-

лая, белорусская черно-пестрая, разводимых в хозяйствах Республики Беларусь.

Ядерную ДНК выделяли из отщипа ушной раковины животных солевым методом [5]. Исследование фрагмента генов *pGH/MspI*, *pIGF-1/*

HhaI, *pIGF-1R/SacII*, *pIGF-2/NciI* проводили методом ПЦР-ПДРФ анализа. Амплификация осуществлялась на автоматическом программируемом термоциклере С 1000™ Thermal Cycler. Праймеры и режимы амплификации для каждого гена для проведения ПЦР представлены в табл. 1.

Таблица 1

Праймеры и режимы полимеразной цепной реакции по генам соматропиновой оси у свиньи домашней (*Sus Scrofa domesticus*)

Ген	Последовательность праймеров	Режим ПЦР
<i>pGH/MspI</i>	F: 5'-GCCAAGTTTTAAATGTCCTG-3' R: 5'-GTGTCCCTCCGGGATGTAG-3'	«Горячий старт»: денатурация (95 °С – 5 мин.). 35 циклов: 95 °С – 45 с, 57 °С – 45 с, 72 °С – 2 мин. Элонгация 10 мин. – 72 °С.
<i>pIGF2/NciI</i> (2 intron)	F: 5'-AGACTCTGTGCGGCGGGGAGCT-3' R: 5'-CGAGTGCGGTCCCAATGGAT-3'	«Горячий старт»: денатурация (95 °С – 5 мин.). 35 циклов: 94 °С – 30 , 68 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин. Элонгация 10 мин. – 72 °С.
<i>pIGF-1/HhaI</i>	F: 5'-AGCCCACAGGGTACGGCTC-3' R: 5'-CGAGTGCGGTCCCAATGGAT-3'	«Горячий старт»: денатурация (95 °С – 5 мин.). 35 циклов: 94 °С – 45 с, 59 °С – 45 с, 72 °С – 1 мин. Элонгация 8 мин – 72 °С.
<i>pIGF-1R/SacII</i>	F: 5'-AGCTATCTCTACCGGCATAA-3' R: 5'-TCTCGAAGACCTTGCGGTACT-3'	«Горячий старт»: денатурация (95 °С – 5 мин.). 35 циклов: 94 °С – 30 с, 53 °С – 30 с, 72 °С – 45 мин. Элонгация 8 мин. – 72 °С.

В нашем исследовании мы изучили полиморфизм гена *pGH/MspI*. Амплификаты фрагмента гена *pGH* подвергались рестрикции эндонуклеазой *MspI* (Fermentas, Литва). По

длине рестриционного фрагмента определяли генотип животного (табл. 2).

На рис. 1 представлены аллельные варианты гена *pGH/MspI*.

Таблица 2

Длина рестриционного фрагмента гена *pGH/MspI* в зависимости от генотипа особи

Генотип особи	Величина рестриционного фрагмента, п.н.
AA	222, 147, 137
AB	284, 222, 147, 137
BB	284, 222

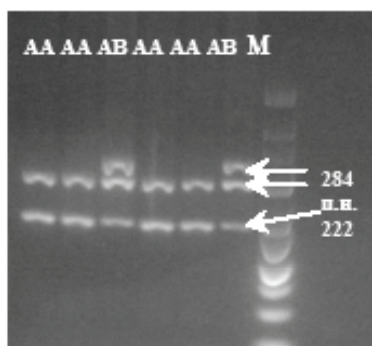


Рис. 1. Аллельные варианты гена *pGH/MspI* свиньи домашней (*Sus scrofa domesticus*). Стрелками указаны длины рестриционных фрагментов; М – маркер GeneRuler Low Range DNA Ladder #SM1191; AA, AB, BB – генотипы животных

Амплификаты фрагмента гена *pIGF-2* во 2 интроне подвергались рестрикции эндонуклеазой *NciI* (Fermentas, Литва). По длине рестрикционного фрагмента определяли генотип животного (табл. 3, рис. 2).

Таблица 3

Длина рестрикционного фрагмента гена *pIGF-2/NciI* в зависимости от генотипа особи

Генотип особи	Величина рестрикционного фрагмента, п.н.
AA	900, 450
AB	900, 800, 450
BB*	800, 450

* – желательный генотип

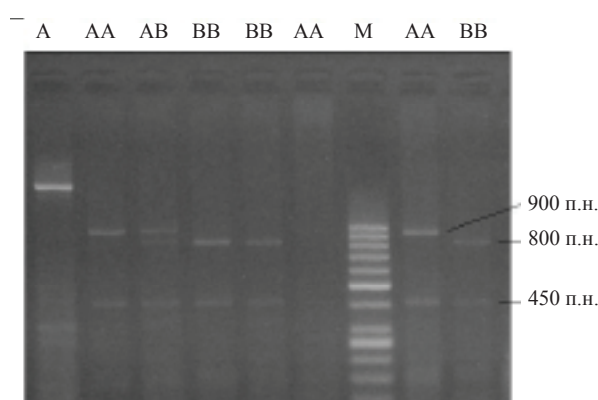


Рис. 2. Аллельные варианты гена *pIGF-2/NciI* свиньи домашней (*Sus scrofa domesticus*). М – маркер; AA, AB, BB – генотипы животных

В данном исследовании мы также изучили полиморфизм гена *pIGF-1/HhaI* и рецептора инсулиноподобного фактора роста (*pIGF-1R/SacII*) у разных пород свиней, разводимых в Республике Беларусь. Амплификаты фрагмента гена *pIGF-1* и *pIGF-1R* подвергались

рестрикции эндонуклеазами *HhaI* и *SacII* (Fermentas, Литва). По длине рестрикционного фрагмента определяли генотип животного (табл. 4, 5). На рис. 3, 4 представлены аллельные варианты генов *pIGF-1/HhaI* и *pIGF-1R/SacII*.

Таблица 4

Длина рестрикционного фрагмента гена *pIGF-1/HhaI* в зависимости от генотипа особи

Генотип особи	Величина рестрикционного фрагмента, п.н.
AA	151, 28
AB	151, 116, 35, 28
BB	116, 35, 28

Таблица 5

Длина рестрикционного фрагмента гена *pIGF-1R/SacII* в зависимости от генотипа особи

Генотип особи	Величина рестрикционного фрагмента, п.н.
AA	379
AB	379, 235, 144
BB	235, 144

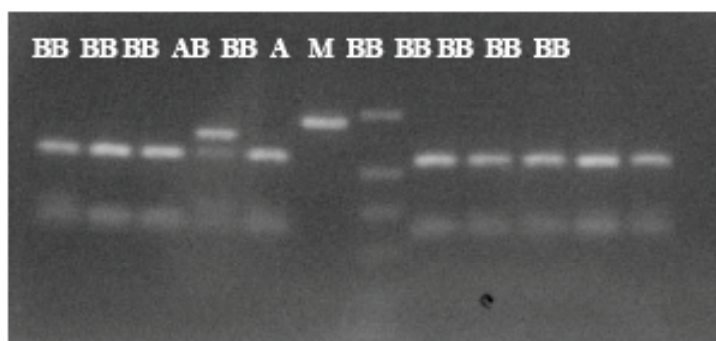


Рис. 3. Аллельные варианты гена *pIGF-1/HhaI* свиньи домашней (*Sus scrofa domestica*). М – маркер (FastRulerUltra Low Range DNA Ladder #SM1233); AA, AB, BB – генотипы животных; А – амплификат

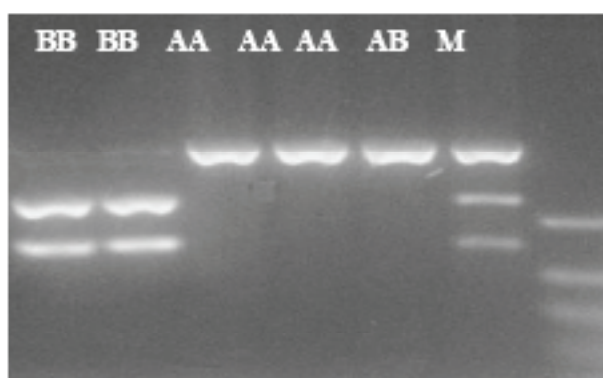


Рис. 4. Аллельные варианты гена *pIGF-1R/SacII* свиньи домашней (*Sus scrofa domestica*). М – маркер (FastRulerUltra Low Range DNA Ladder #SM1233); AA, AB, BB – генотипы животных

Результаты и обсуждение

Гормон роста – это полифункциональный эндогенный фактор, главная функция которого направлена на стимуляцию роста и развитие животного [9]. Ген гормона роста отвечает за синтез соматотропина. Ген *pGH* локализован на 12 хромосоме р1.4 и включает 5 экзонов и 4 интрона [6, 7, 8]. Кодировочная область состоит из пяти экзонов, общая площадь транскрипции, около 1,7 Кб. *pGH* – один из наиболее исследованных среди QTL-генов. Его можно

считать прямым молекулярно-генетическим маркером, поскольку он является структурным геном.

В нашем исследовании мы изучили полиморфизм фрагмента гена *pGH/MspI* длиной 506 п.о. Данные о распределении частот аллелей и генотипов по локусу гена *pGH/MspI* у хряков породы белорусская черно-пестрая ($n = 17$) представлены в табл. 6.

В выборке из популяции свиней белорусской

Таблица 6

Частоты аллелей и генотипов по локусу гена *pGH/MspI*

Предприятия	Группа животных	Количество особей	Всего генотипов			Частота генотипов, %			Частота встречаемости аллелей	
			AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B
СГЦ «Заречье, «Вихра», п/з «Ленино»	Хряки	17	14	3	–	82,35	17,65	–	0,912 ±0,069	0,088 ±0,069

черно-пестрой породы выявлен полиморфизм гена *pGH/MspI*. Частота гомозигот AA-*pGH/MspI* была выше, чем гетерозигот AB-*pGH/MspI*. Животных с гомозиготным генотипом BB-*pGH/MspI* выявлено не было. Аллель А встречался с частотой 0,912, а аллель В – 0,088.

У свиньи ген инсулиноподобного фактора роста-2 (*pIGF2*) локализован на 2-й хромосоме. Этот ген определен как ген-кандидат увеличения мышечной массы и отложения жира [10]. Ген *IGF2* в геномах свиней может быть представлен несколькими аллельными вариантами, появление которых связано с одиночными нуклеотидными заменами во втором интроне (замена G→A), аллели А и В [11, 12]. Влияние полиморфизма, находящегося вне кодирующей области гена, на хозяйственно-ценные качества свиней объясняется способ-

ностью аллеля дикого типа (G) связываться с репрессорными ядерными белками и, таким образом, подавлять транскрипцию гена *IGF2*. Замена нуклеотида ингибирует это взаимодействие, что в результате сказывается на экспрессии гена. В наследовании гена *IGF-2* проявляется патернальный эффект – у потомства проявляется действие только отцовского аллеля, что значительно облегчает селекцию по данному гену, так как для достижения положительного эффекта у потомства достаточно тестировать только хряков.

В нашем исследовании изучена выборка из популяции (n = 174) хряков-производителей по гену *pIGF-2/NciI* (intron2). В табл. 7 приведены данные о распределении частот аллелей и генотипов *pIGF-2/NciI* в зависимости от породы свиньи.

Таблица 7

Частоты аллелей и генотипов гена *pIGF-2/NciI* в выборках популяций свиней разных пород в Республике Беларусь

Порода	Количество особей	Всего генотипов			Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
		AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B*
Ландрас	41	1	7	33	2,44	17,07	80,49	0,110	0,890
Йоркшир	5	–	4	1	–	80,0	20,0	0,4	0,6
Белорусская крупная белая	26	16	6	4	61,54	23,08	15,38	0,731	0,269
Белорусская черно-пестрая	20	14	3	3	70,00	15,00	15,00	0,775 ±0,093	0,225 ±0,093
Белорусский заводской тип породы йоркшир	21	–	4	17	–	19,05	80,95	0,095 ±0,064	0,905 ±0,604
Всего	113	31	24	58	27,43	21,24	51,33	0,381 ±0,046	0,619 ±0,046

* – желательный аллель гена

Предпочтительным является генотип BB-*pIGF-2/NciI*. Согласно литературным данным, для популяции свиней крупной черной породы, отличающейся относительно высоким уровнем осаленности туши, характерны животные только с генотипом AA-*pIGF-2/NciI*, а в ультрамясной породе пьетрен аллель А не обнаруживается вовсе [11]. В нашем исследовании гено-

тип BB-*pIGF-2/NciI* встречается с наибольшей частотой 80,49 % у хряков породы ландрас канадской селекции. И напротив, частота генотипа AA-*pIGF-2/NciI* была выше у пород крупная белая и йоркшир белорусской селекции и составляла соответственно 61,54% и 70%.

Инсулиноподобный фактор роста IGF-1 – еще один из важнейших представителей се-

мейства инсулиноподобных факторов роста, осуществляющих эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма. Инсулиноподобными эти факторы названы в связи с их способностью стимулировать поглощение глюкозы мышечной и жировой тканью аналогично инсулину. Одним из важных эффектов IGF-1 является стимуляция роста костей в длину. Рост-стимулирующий эффект гормона роста (GH) опосредуется IGF-гормонами, которые образуются под влиянием GH в печени и других тканях. Выделены два вида IGF: инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) и инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF-2). Это близкие по строению белки, сходные с проинсулином. IGF-1 и IGF-2 присутствуют в сыворотке крови преимущественно в виде комплексов со связывающими белками.

Так же как и гормон роста, оба IGF действуют на гипоталамус и аденогипофиз по принципу обратной связи, контролируя синтез соматoliberина и соматостатина и секрецию гормона роста. При низком уровне IGF-1 в крови секреция соматoliberина и соматотропина возрастает, при высоком – снижается. Таким образом, гормон роста осуществляет биологическое действие через секрецию соматомединов (IGF-1 и IGF-2), которые образуются в печени и других периферических тканях и являются посредниками анаболического и ростового влияния соматотропного гормона [13, 14]. Ген *pIGF-1* у свиньи находится на хромосоме 5q23–24 [15].

В нашем исследовании изучена замена G201A в 3 экзоне *pIGF-1/HhaI*. В табл. 8 приведены данные о распределении частот аллелей и генотипов *pIGF-1/HhaI*.

Таблица 8

Частоты аллелей и генотипов гена *pIGF-1/HhaI* в выборках популяций свиней разных пород в Республике Беларусь

Порода	Количество особей	Всего генотипов			Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
		AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B
Ландрас	40	–	–	40	–	–	100	–	1
Йоркшир	38	–	–	38	–	–	100	–	1
Белорусская крупная белая	26	–	2	24	–	7,69	92,31	0,038 ±0,038	0,962 ±0,038
Белорусская черно-пестрая	19	1	2	16	5,26	10,53	84,21	0,105 ±0,07	0,895 ±0,07
Белорусский заводской тип породы йоркшир	11	–	–	11	–	–	100	–	1
Всего	134	1	4	129	0,75	2,98	96,27	0,022 ±0,013	0,978 ±0,013

Как показал анализ генетической структуры популяций *Sus Scrofa domesticus* по гену *pIGF-1/HhaI* у свиней пород йоркшир и ландрас канадской селекции, полиморфизм по данному локусу гена *pIGF-1/HhaI* не выявлен. В популяциях свиней пород белорусская черно-пестрая и белорусская крупная белая был выявлен полиморфизм *pIGF-1/HhaI*. Частота аллели А составила 0,022. Частота

генотипа AA-*pIGF-1/HhaI* равна 0,75 (n = 1), AB-*pIGF-1/HhaI* соответственно равна 2,98 (n = 4).

Согласно литературным данным, аллель А *pIGF-1/HhaI*, является нежелательным и его частота превышает частоту аллеля В в популяции тибетских свиней. Аллель А предположительно связан с низкой скоростью роста у карликовых свиней [16].

Ген, кодирующий рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (*pIGF1R*), локализован на хромосоме 1 в области q1.7–p2.1 [17]. *IGF1R* состоит из 1367 остатков аминокислот. Ген *pIGF1R* – новый маркер для репродуктивных качеств свиноматок. Согласно результатам исследований польских ученых, у свиноматок с

генотипом ВВ приплод был выше по сравнению со свиноматками с генотипами АВ и АА [18].

В нашем исследовании мы изучили полиморфизм в 9 интроне локуса гена *pIGF-1R/SacII*. Данные о распределении частот аллелей и генотипов по локусу гена *pIGF-1R/SacII* по отдельным хозяйствам представлены в табл. 9.

Таблица 9

Частоты аллелей и генотипов по локусу гена *pIGF-1R/SacII*

Предприятие	Группа животных	Порода	Количество особей	Всего генотипов			Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
				АА	АВ	ВВ	АА	АВ	ВВ	А	В
ОАО «Журавлиное»	Свиньи	Йоркшир	4	4	–	–	100	–	–	1	–
		Ландрас	4	2	2	–	50	50	–	0,75± 0,216	0,25± 0,216
	Хряки	Йоркшир	1	1	–	–	100	–	–	1	–
		Ландрас	1	1	–	–	100	–	–	1	–
В среднем по хозяйству			10	8	2	–	80	20	–	0,9± 0,095	0,1± 0,095
СГЦ «Заднепровский»	Хряки	Белорусская крупная белая	10	5	4	1	50	40	10	0,7± 0,145	0,3± 0,145
Всего			20	13	6	1	65	30	5	0,8± 0,089	0,978 ±0,013

Как показал генетический анализ, в выборке из популяции свиней пород йоркшир и ландрас канадской селекции частота гомозиготного генотипа АА-*pIGF-1R/SacII* была выше (80%), чем

частота гетерозиготного генотипа (20%). Особей с гомозиготным генотипом ВВ-*pIGF-1R/SacII* обнаружено не было. У породы белорусская крупная белая выявлены все возможные генотипы.

Заключение

Изучен полиморфизм генов гормонального ряда соматропиновой оси *pGH/MspI*, *pIGF-1/HhaI*, *pIGF-1R/SacII*, *pIGF-2/NciI*. Определены частоты аллелей и генотипов изученных генов в выборках пород свиньи домашней, разводимых в Республике Беларусь. Изученные гены потенциально могут быть использованы в качестве маркеров. Такой подход является оправданным, когда выявленные

гены имеют функции, связанные с чертами, представляющими интерес в свиноводстве. Поэтому в дальнейшем нами планируется поиск ассоциаций аллельных вариантов изученных генов с хозяйственно-полезными признаками у свиньи домашней (*Sus Scrofa domestica*).

Работа частично финансировалась грантом БИИ-БРУ-014.

Список использованных источников

1. Алтухов, Ю.П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 9. – С. 1173–1195.
2. Ibeagha-Awemu, E.M. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig / E.M. Ibeagha-Awemu, P. Kgwatalala, A.E. Ibeagha, X. Zhao // Mamm. Genome. – 2008. – V. 19. – P. 226–245.
3. Smith, C. The use of genetic polymorphisms in livestock improvement / C. Smith, S.P. Simpson // Journal of Animal Breeding and Genetics. – 1986. – V. 103. – P. 205–217.
4. Калашникова, Л.А. Селекция XXI века: использование ДНК-технологий / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко. – Московская обл, Лесные Поляны, ВНИИплем, 2000. – 31 с.
5. Miller, S. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells / S. Miller, D. Dykes, H.F. Polesky // Nucleic Acids Research. – 1988. – V. 16. – P. 12–15.
6. LI Jing. Identification and function of the growth hormone gene in Rongjiang pig of China / LI Jing, Ran Xue-Qin, Wang Jia-Fu // Acta Physiologica Sinica. – 2006. – V. 58 (3). – P. 217–224.
7. Location of the porcine hormone gene to chromosome 12p1.2~p1.5 / M. Yerle [et al.] // Journal of Animal Genetics. – 1993. – V. 24. – P. 129–131.
8. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-Yuan pigs / W.T.K. Cheng, C.H. Lee, C.M. Hung, I.T.J. Chang, C.M. Chen // Theriogenology. – 2000 – V. 54. – P. 1225–1237.
9. Балацкий, В.Н. Полиморфный BsuRI – сайт рестрикции гормона роста свиньи / В.Н. Балацкий, К.Ф. Почерняев // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 29, № 1. – С. 45–48.
10. An imprinted QTL with majoreffect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs / C. Nezer, [et al.] // Nature Genetics. – 1999. – V. 21. – P. 155–156.
11. Балацкий, В.Н. Распределение IGF2-аллелей и генотипов в породах свиней разного направления продуктивности / В.Н. Балацкий, Т.В. Овсяник // 7-я Международная научная конференция-школа: «Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: роль нанотехнологий в реализации приоритетных задач биотехнологии», БиоТехЖ. – 2008. – Дубровицы. – 2008. – С. 125–129.
12. A NciI PCR-RFLP within intron 2 of the porcine insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene / A. Knoll [et al.] // Journal of Animal Genetics. – 2000. – V. 31. – P. 150–151.
13. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals / D. Schams [et al.] // Domestic Animal Endocrinology. – 1999. – V. 17. – P. 279–285.
14. Developmental expression and location of IGF-I and IGF-II mRNA and protein in skeletal muscle / D.E. Gerrard [et al.] // Journal of Anim. – 1998. V. 76. – P. 1004–1011.
15. Assignment of the gene for porcine insulin-like growth factor 1 (IGF1) to chromosome 5 by linkage mapping / A.K. Winteroe [et al.] // Journal of Animal Genetics. – 1994. – V. 25. – P. 37–39.
16. Polymorphisms of the Porcine Growth Hormone Gene (*pGH*) in Tibet Pig / Zhang Hao [et. al.] // Acta Agriculturae Boreali-accidentalis Sinica. – 2010. – V. 19 (2). – P. 15–19.
17. Localization of IGF1R and EDN genes to pig chromosomes 1 and 7 by in situ hybridization / Y. Lahbib-Mansais, M. Yerle, J. Gellin // Cytogenetic Cell Genetics. – 1995. – V. 71 (3). – P. 225–227.
18. Terman, A. The IGF1R gene: A new marker for reproductive performance traits in sows? / A. Terman // Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science. – 2011. – V. 61. – P. 67–71.

Дата поступления статьи 14 декабря 2012 г.

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ К БИОТИЧЕСКИМ И АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ ГИБРИДОВ ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ, СОЗДАНЫХ НА ОСНОВЕ ОБРАЗЦОВ РАЗЛИЧНОГО ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

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

Введение

Тритикале – пшенично-ржаной гибрид, сочетающий качества обоих родительских видов, и перспективная культура для производства комбикорма, крахмала, солода и спирта. Благодаря достижениям мировой селекции, тритикале играет все более заметную роль в сельскохозяйственном производстве. Анализ мировых генетических ресурсов показывает, что в последние 10–15 лет сорта этой культуры неузнаваемо изменились. Селекционеры преодолели многие присущие ей недостатки: частичную стерильность цветков, морщинистость зерна, высокорослость, изреженность стеблестоя к уборке и др. Современные сорта тритикале успешно конкурируют по урожайности зерна и зеленой массы с лучшими сортами ржи, ячменя, овса и пшеницы. В то же время культура не лишена ряда недостатков, к которым, в частности, относятся низкие хлебопекарные качества, склонность к полеганию и прорастанию зерна на корню. Наблюдается также постепенное снижение устойчивости тритикале к воздействиям биотических и абиотических стрессов. Для решения этих вопросов необходимо расширение и обогащение генофонда тритикале за счет вовлечения нового исходного материала [1, 2]. Ускорить создание ценных образцов помогает сотрудничество с зарубежными партнерами и селекционерами, обмен информацией и материалом между учеными различных стран, расположенных в разных климатических и почвенных зонах.

В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси имеется коллекция элитных линий озимой тритикале из Международного центра по улучшению кукурузы и пшеницы (СІММУТ, Мексика), которая является носителем новых генетических источников. Из данной коллек-

ции нами отобраны 15 перспективных образцов для возделывания в условиях Беларуси [3]. Также в исследование включены 3 сорта тритикале: Михась (Беларусь), Вольтарио, Гренадо (Польша); 7 линий тритикале, созданных в Институте генетики и цитологии на основе изогенных по генам *Vrn 1-3* линий мягкой пшеницы и озимой ржи сорта Восход [4].

Известно, что при скрещивании генетически отдаленных форм вероятность получения высокопродуктивных гибридов возрастает. В связи с этим, ранее нами была изучена молекулярно-генетическая гетерогенность 24 образцов озимой тритикале на основе ISSR- и RAPD- анализа с использованием высокополиморфных праймеров, отобранных на основании литературных данных [5, 6]. Анализ полиморфизма фрагментов ДНК при использовании этих ISSR- и RAPD- праймеров позволил различить образцы озимой тритикале и подобрать генетически дивергентные родительские пары для скрещиваний [7]. По данным молекулярного анализа, существенные различия обнаружены между линиями тритикале, созданными в Институте генетики и цитологии, и образцами из коллекции СІММУТ. Значения генетических дистанций, выявленные между ними, варьировали от 15,2 до 33,8. С целью расширения генофонда и получения гетерозисных гибридов для скрещивания по схеме топкросса 6×4 в качестве материнских форм использовали образцы из Мексики и 4 линии, созданные нами. Цель данного исследования состояла в оценке зимостойкости и устойчивости к наиболее распространенным грибным патогенам гибридов F_1 озимой тритикале, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили гибриды тритикале F_1 , полученные в результате скрещивания в системе топкросса шести сортообразцов из коллекции СИММУТ (Мексика) – 2м, 4м, 16м, 29м, 42м, 44м и четырех высокопродуктивных форм, синтезированных в ИГЦ НАН Беларуси – М13/Восход, 105/12-1, Опал/Восход, 105/12-2. Анализировали зимостойкость полученных гибридов F_1 в сравнении с родительскими формами. Для оценки зимостойкости осенью и весной подсчитывали число растений на делянках и по соотношению числа перезимовавших растений к числу взошедших осенью определяли процент перезимовки каждого образца. Для количественной оценки гетерозиса по признаку «зимостойкость» использовали 2 метода: по отношению к среднему выражению признака

у родителей (H_{cp}) и к лучшему родителю (истинный гетерозис – H_n).

Оценка устойчивости гибридов тритикале F_1 и родительских форм к мучнистой росе (*Blumeria tritici*), септориозу (*Septoria nodorum*, *Septoria tritici*) и к листовой ржавчине (*Puccinia triticina*) осуществлена на естественном инфекционном фоне в полевых условиях на Биологической опытной станции ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». Учет поражения грибными патогенами проводили по проценту развития болезни на флаговом листе (фаза «молочно-восковая спелость») по шкале Гешеле [8]. На основе полученных данных по устойчивости проведен кластерный анализ по методу невзвешенного попарного арифметического среднего (UPGMA) с использованием программы Statistica, версия 7.

Результаты и обсуждение

Воздействие низких температур – один из наиболее распространенных стрессовых факторов, лимитирующих рост, развитие и продуктивность культурных злаков, в связи с чем нами проведена оценка зимостойкости полученных гибридов тритикале F_1 . Степень перезимовки родительских образцов тритикале колебалась от 20,0% до 100% (рис. 1). Необходимо отметить, что образ-

цы коллекции СИММУТ показали зимостойкость выше, чем у стандарта – сорта Михась, процент перезимовки которого составил 71,7%. Исключением был только образец 16м, который характеризовался небольшим значением по данному показателю (40%). Среди форм, полученных нами, можно выделить Опал/Восход, степень перезимовки которой составила 96,3%.



Рис. 1. Степень перезимовки (%) родительских форм озимой тритикале в сравнении со стандартом – сортом Михась

Процент перезимовки гибридов тритикале F_1 колебался в значительных пределах – от 20,4 до 100%. Можно отметить, что у 12 из

24 гибридных образцов анализируемый показатель превышал стандарт – сорт тритикале Михась (табл. 1).

Таблица 1

Степень перезимовки и гетерозис у гибридов тритикале F₁

Гибридные комбинации	Перезимовка, %	Г _{сп} , %	Г _г , %
2м × М13 / Восход	65,52	-5,27	-6,4
2м × 105/12-1	80,10	31,54	14,43
2м × Опал / Восход	54,55	-34,45	-43,43
2м × 105/12-2	75,0	66,67	7,14
4м × М13 / Восход	50,0	-27,95	-34,89
4м × 105/12-1	54,0	-16,01	-29,68
4м × Опал / Восход	83,33	-3,79	-13,58
4м × 105/12-2	60,29	24,58	-21,49
16м × М13 / Восход	66,67	30,73	7,53
16м × 105/12-1	50,0	8,94	-3,46
16м × Опал / Восход	82,96	21,62	-13,97
16м × 105/12-2	58,07	93,57	45,18
29м × М13 / Восход	60,0	-25,93	-40,0
29м × 105/12-1	80,0	5,41	-20,0
29м × Опал / Восход	94,96	-3,31	-5,04
29м × 105/12-2	73,0	21,67	-27,0
42м × М13 / Восход	100	32,55	12,5
42м × 105/12-1	64,29	-8,6	-27,67
42м × Опал / Восход	83,33	-10,07	-13,58
42м × 105/12-2	80,0	46,94	-10,0
44м × М13 / Восход	66,67	-11,75	-25,17
44м × 105/12-1	87,50	24,22	-1,78
44м × Опал / Восход	82,22	-11,36	-14,74
44м × 105/12-2	20,37	-62,65	-77,14

Высокие значения по зимостойкости наблюдались в комбинациях, созданных на основе тритикале 42м (табл. 1). Из отцовских компонентов скрещивания можно выделить Опал/Восход. Гибриды, у которых данная линия выступала в роли опылителя, как правило, демонстрировали зимостойкость выше 80%. Так, у 16м × Опал/Восход степень перезимовки составила 82,9%, у 42м × Опал/Восход – 83,3%, у 29м × Опал/Восход – 94%. Необходимо отметить, что сами родительские формы (42м и Опал/Восход) характеризовались высокими значениями по степени перезимовки (рис. 1).

Гетерозис по отношению к среднему значению признака у родителей выявлен у 12 гибридных комбинаций из 24 (табл. 1).

Уровень гетерозиса варьировал в зависимости от комбинации скрещивания от 5,41% (29м × 105/12-1) до 93,57% (16м × 105/12-2). Можно отметить, что гетерозисный эффект по зимостойкости наблюдался во всех комбинациях, созданных с участием мексиканского образца 16м. Превышение над лучшим родителем (истинный гетерозис) по данному признаку проявлялось несколько реже (у 5 гибридных комбинаций из 24) и составило 7,14–48,18% (табл. 1).

На основании полученных результатов можно выделить комбинации 2м × 105/12-1, 16м × 105/12-2 и 42м × М13/Восход, которые по степени перезимовки значительно превосходили обоих родителей (табл. 1).

Еще одна актуальная проблема для тритикале – создание сортов с комплексной устойчивостью к патогенам, так как патогенные микроорганизмы наносят существенный урон культивируемым сортам злаков, а использование химических средств защиты требует значительных материальных затрат и приносит большой ущерб экологии. Наиболее распространенные грибные патогены,

поражающие посевы тритикале на территории Беларуси – септориоз (*Septoria nodorum*, *Septoria tritici*), мучнистая роса (*Blumeria tritici*), бурая ржавчина (*Puccinia triticina*). С целью выделения устойчивых к данным патогенам генотипов была осуществлена оценка гибридов озимой тритикале F₁, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения.

Таблица 2

Степень поражения родительских форм тритикале мучнистой росой (патоген – *B. tritici*), септориозом (патогены – *S. nodorum* и *S. tritici*) и бурой ржавчиной (патоген – *P. triticina*)

Генотип	Степень поражения флагового листа, %		
	Мучнистой росой	Септориозом	Листовой ржавчиной
2м	0	5	0
4м	0	5	0
16м	5	5	0
29м	15–25	15	0
42м	0	0	0
44м	0	0	5
М13 / Восход	0	0	50
105/12-1	0	5	5
Опал / Восход	0	5–10	0
105/12-2	0	5	0

Анализ устойчивости родительских форм к мучнистой росе показал, что все линии тритикале, полученные нами, не поражались данным патогеном (табл. 2). Большинство образцов коллекции СИММУТ также обладало высокой устойчивостью (степень поражения растений не превышала 5%). Средний уровень восприимчивости к *B. tritici* (до 25% поражения флагового листа) отмечен только для образца 29м. Родительские формы тритикале проявили достаточно высокую устойчивость к септориозу. Степень поражения данным патогеном не превышала 15%, причем 70% родительских линий характеризовались высокой резистентностью. Восприимчивость к бурой ржавчине отмечена только для линии М13/Восход, степень поражения листовой пластинки у которой достигала 50%. Остальные исходные генотипы были устойчивы к *P. triticina* (табл. 2).

Из 24 оцененных гибридов тритикале большинство генотипов продемонстрировало высокую устойчивость к мучнистой росе (рис. 2а), причем у 50% из них патоген не был обнаружен. Наибольшая степень поражения флагового листа данным патогеном составила 15% и отмечена только для 8,3% генотипов, созданных на основе чувствительного к *B. tritici* образца 29м.

Исследованные генотипы проявили определенную степень резистентности к септориозу: 25% гибридных образцов характеризовались высокой устойчивостью к данному патогену, 41,7% – относительной устойчивостью, 33,3% – средней устойчивостью (рис. 2б). Большая часть гибридного материала характеризовалась относительной устойчивостью к септориозу (степень поражения до 10%). Наибольшая устойчивость обнаружена для комбинаций, у которых в качестве отцовской формы использовалась линия 105/12-2

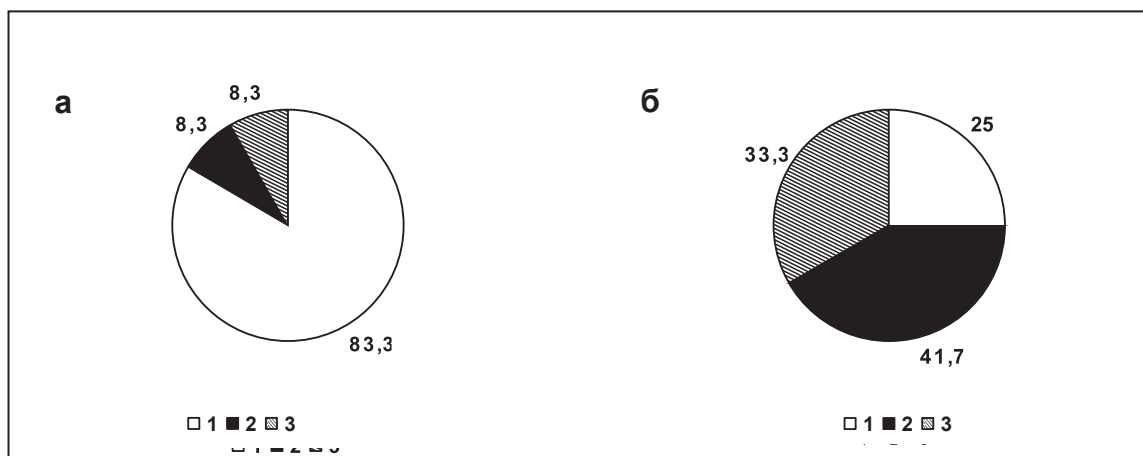


Рис. 2. Оценка устойчивости гибридов тритикале F_1 к мучнистой росе (а) и септориозу (б): 1 – высокоустойчивые, 2 – устойчивые, 3 – среднеустойчивые

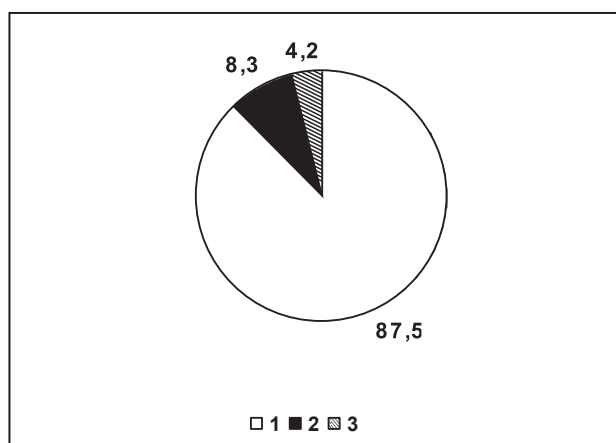


Рис. 3. Оценка устойчивости гибридов тритикале F_1 к бурой ржавчине: 1 – высокоустойчивые, 2 – устойчивые, 3 – среднеустойчивые

(4м × 105/12-2, 42м × 105/12-2, 44м × 105/12-2).

Среди оцененных гибридов в условиях естественного инфекционного фона бурой ржавчиной в той или иной степени поражались только 9 из 24 образцов, причем степень поражения флагового листа большинства из них не превышала 5%. Чувствительность к данному патогену (степень поражения листовой пластинки – 50%) проявил только один гибрид 16м × М13/Восход. На дендрограмме, построенной на основании результатов оценки устойчивости к трем грибным патогенам, видно, что данный генотип сформировал отдельную ветвь кластера. Гибриды 2м × М13/Восход и 2м × 105/12-2, обладающие средним уровнем устойчивости к *P. triticina*, также значительно отличались от изученных генотипов и объединены в отдельный кластер (рис. 4). Остальные

гибриды сгруппировались в один большой кластер, в котором одна группа представлена 7 образцами, характеризующимися высокой устойчивостью к мучнистой росе и ржавчине и относительной устойчивостью к септориозу (рис. 4). Еще одну группу сформировали генотипы, высокоустойчивые ко всем трем заболеваниям (4м × Опал/Восход, 4м × 105/12-2, 42м × М13/Восход, 44м × М13/Восход, 44м × 105/12-2). Для гибридов 4м × М13/Восход, 29м × Опал/Восход, 29м × 105/12-2, 44м × 105/12-1 выявлена высокая устойчивость к мучнистой росе и бурой ржавчине, средний уровень резистентности к септориозу. 16м × 105/12-1, 16м × Опал/Восход, 29м × М13/Восход и 29м × 105/12-1 характеризовались средней степенью поражения флагового листа мучнистой росой и септориозом (не более 15%).

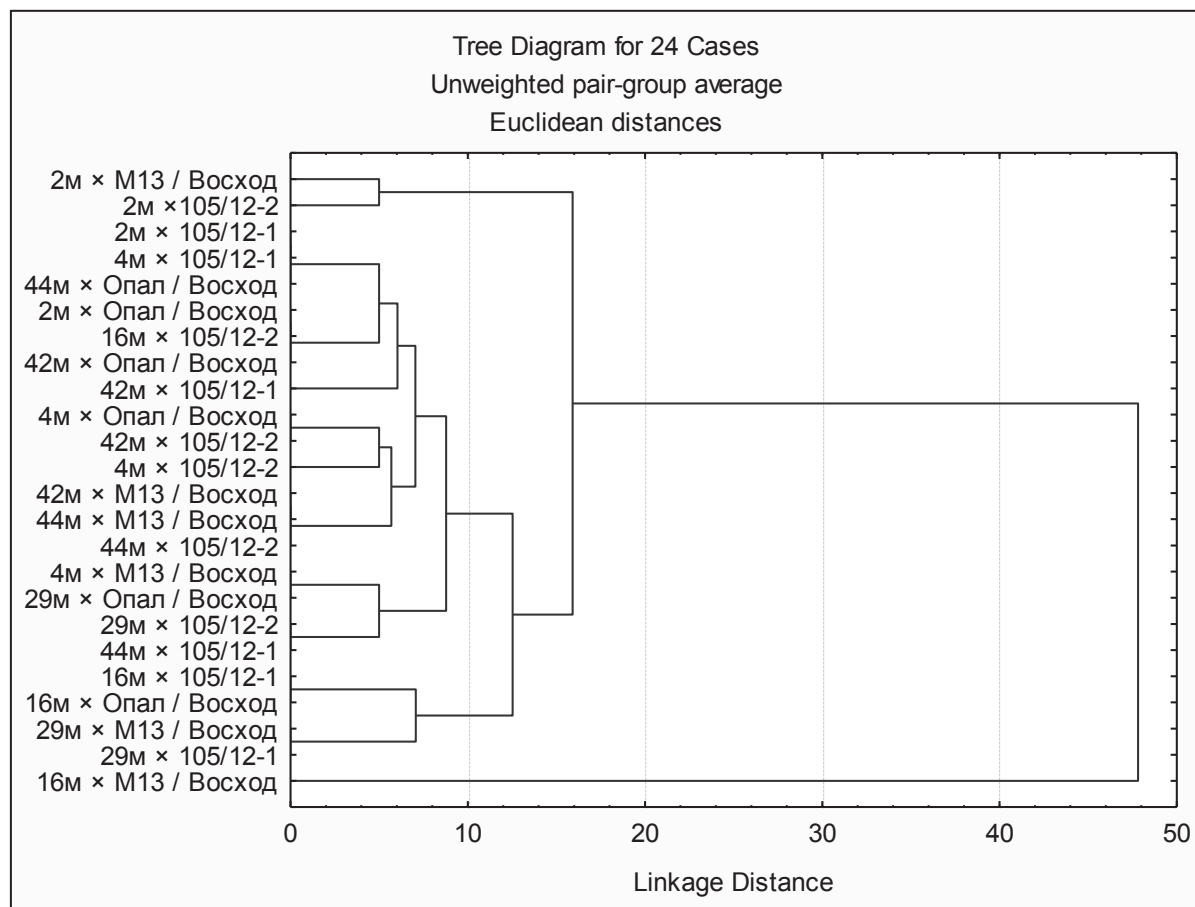


Рис. 4. Дендрограмма, построенная на основании полученных данных по устойчивости к мучнистой росе, септориозу и бурой ржавчине гибридов тритикале F_1

Заключение

В результате проведенного исследования гибридов тритикале F_1 , созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения, выявлены генотипы с высокой устойчивостью к мучнистой росе (83,3%), бурой ржавчине (87,5%) и септориозу (25%). Резистентность одновременно к двум заболеваниям проявило 50% изученных гибридов, к трем – 16,7%. По изученным показателям выделялись комбинации, созданные на основе образца 42м из коллекции СИММУТ. Гибриды 42м × М13/Восход и 42м × 105/12-2 наряду с комплексной

устойчивостью к патогенам характеризовались высокой степенью перезимовки, 42м × Опал/Восход не поражен мучнистой росой, бурой ржавчиной и проявил высокую зимостойкость (рис. 4, табл. 1.). Полученные данные свидетельствуют о перспективности вовлечения в гибридизацию образцов из мирового генофонда для создания ценного исходного материала тритикале с повышенной устойчивостью к воздействиям биотических и абиотических стрессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (№ Б11-066).

Список использованных источников

1. Gruszecka, D. Yield structure of triticale strains achieved due to crossbreeding with *Aegilops* / D. Gruszecka, K. Kowalczyk // Proc. 5th Inter. Triticale Symp., Radzikow, Poland, June 30. – July 5 2002. – Vol. 2. – P. 345–349.
2. Sodkiewicz, W. Chromosomal location in

triticale of leaf rust resistance genes introduced from *Triticum monococcum* / W. Sodkiewicz, A. Strzembicka, B. Apolinska // Plant Breeding. – 2008. – V. 127. – P. 364–367.

3. Орловская, О.А. Оценка продуктивности и зимостойкости элитных линий

тритикале из коллекции Международного центра по улучшению кукурузы и пшеницы в условиях Беларуси / О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева // Материалы Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь. 19–22 июня 2012 г. – Ч. 2. – С 333–335.

4. Khotyljova, L.V. Development and study of spring triticale lines with *Vrn* genes / L.V. Khotyljova, L.V. Koren, L.N. Kaminskaya // 4th International Triticale Symposium, Alberta, Canada. – 1998. – P. 21–23.

5. Sozen, E. Evaluation of ISSR markers to assess genetic variability and relationship among

winter triticale (*× Triticosecale Wittmack*) cultivars / E. Sozen // Pak. J. Bot. – 2010. – V. 42. – № 4. – P. 2755–2763.

6. Nimal, S. RAPD analysis for genetic polymorphism in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes varying for grain protein content / S. Nimal, R.K. Behl, A.K. Chhabra // The South Pacific Journal of Natural Science. – 2009. – V. 27. – P. 49–56.

7. Орловская, О.А. ISSR-анализ образцов озимой тритикале (*× Triticosecale Wittmack*) различного эколого-географического происхождения / О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева // Доклады НАН Беларуси. – 2012. – Т. 56. – № 2. – С. 78–81.

8. Гешеле, Э.Э. Основы фитопатологической оценки в селекции растений / Э.Э. Гешеле. – М.: Колос, 1978. – 208 с.

Дата поступления статьи 14 декабря 2012 г.

РАЗВИТИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ГЕНЕТИКИ И БИОИНФОРМАТИКИ В БЕЛАРУСИ (обзорная статья)

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

Введение

Развитие методов прикладной математики, возникновение кибернетики и совершенствование компьютерной техники и программного обеспечения привело к тому, что моделирование, применявшееся ранее в основном в физических науках, нашло свое приложение в биологии, геологии, химии и других отраслях естествознания. Математическое моделирование позволяет этим наукам заглянуть вглубь явлений, описать их точным языком формул и уравнений.

Математико-статистические методы, применяемые в биологии, разрабатываются иногда вне зависимости от биологических исследований, но чаще в связи с задачами, возникающими в биологии, сельском хозяйстве и медицине. Таковы работы Ф. Гальтона, внесшего большой вклад в создание корреляционного и регрессионного анализа, и К. Пирсона – основателя крупнейшей биометрической школы, проанализировавшего основные типы распределений, встречающиеся в биологии. Он также предложил один из самых распространенных статистических методов – критерий «хи-квадрат», и развил теорию корреляции. Методология современной биометрии создана главным образом Р. Фишером. Р. Фишер впервые показал, что планирование экспериментов и наблюдений и обработка их результатов – неразрывно связанные задачи статистического анализа. Он

зложил основы теории планирования эксперимента, предложил ряд эффективных статистических методов (прежде всего, дисперсионный анализ), которые широко используются в генетико-статистических моделях или в биометрической генетике.

Генетика вообще является прекрасным примером применения математики для решения чисто биологических задач. Уже законы наследования, открытые основоположником генетики Г. Менделем, были сформулированы на строгом математическом уровне и лежат в основе современной генетики, являющейся, пожалуй, наиболее математизированной наукой из всех биологических дисциплин.

Развитие и совершенствование компьютерной техники и программного обеспечения в последней трети XX в. привели к возникновению биоинформатики – науки, занимающейся изучением организации, функционирования, развития, а также патологических состояний живых систем различного уровня методами и средствами математики и информатики.

В статье анализируется развитие математической биологии и биоинформатики в нашей стране на примере математической генетики и ряда информационных приложений, используемых в генетике и селекции растений, медицинской генетике, цитологии, лесоведении, онкологии и т.д.

Биометрическая генетика

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси является ведущим учреждением республики в области математической генетики и биометрического моделирования генетико-селекционного процесса. Становление в Беларуси исследований по математической генетике и биометрии связано с именем академика П.Ф. Рокицкого. Он – автор многократно переиздававшегося учебника «Биологиче-

ская статистика» [1], по которому училось не одно поколение советских биологов, а также фундаментального руководства «Введение в статистическую генетику» [2]. За разработку проблем статистической генетики, внедрение математических методов в различные области биологии П.Ф. Рокицкому в 1974 г. была присуждена Государственная премия БССР. Его учеником, членом-корреспондентом В.К. Сав-

ченко, в 1970–1977 гг. создан ряд математических и компьютерных моделей генетической структуры диплоидных и полиплоидных популяций по качественным и количественным признакам, предложена система сетевых пробных скрещиваний [3, 4].

В течение многих лет в Институте генетики и цитологии изучаются математические вопросы гетерозиса, совершенствования количественных методов его оценки. В лаборатории гетерозиса и генетики количественных признаков (ныне лаборатория экологической генетики и биотехнологии) академиком Л.В. Хотылевой и к.б.н. Л.А. Тарутиной предложена математическая модель и схемы анализа комбинационной способности, степени ее взаимодействия с условиями окружающей среды при диаллельных скрещиваниях [5, 6].

Разработка пакетов генетико-статистических программ

Более 30 лет в институте разрабатываются прикладные программы для ЭВМ по генетико-статистическому анализу экспериментальных данных и математическому моделированию. В конце 1980-х–начале 1990-х гг. в двух разных группах независимо были созданы два пакета прикладных биометрических программ: АБ-СТАТ (к.б.н. Б.Ю. Аношенко – работа начиналась в БелНИИ земледелия и кормов) [11] и РИШОН (д.б.н. С.Е. Дромашко, С.Р. Мац, Г.И. Френкель и др., группа автоматизации научных исследований – ныне лаборатория моделирования генетических процессов) [12, 13]. Актуальность этих разработок подкрепляется тем, что в настоящее время на компьютерном рынке отсутствуют современные объектно-ориентированные программные средства для обработки генетико-селекционных данных и оптимизации и ускорения процесса количественной оценки нового генофонда растений по показателям продуктивности с учетом влияния факторов среды (общая и специфическая комбинационная способность, коэффициенты наследуемости, зависимость урожайности от эколого-генетических факторов, устойчивость к основным биотическим и абиотическим стрессам, минимизация приемов интенсификации выращивания).

Имеющиеся статистические пакеты, например SYSTAT, STATGRAPH или STATISTICA, нацелены на обработку обезличенных дан-

В Белорусской государственной сельскохозяйственной академии на протяжении многих лет биометрический подход использовался учеником Л.В. Хотылевой членом-корреспондентом А.В. Кильчевским. Им разработаны принципы и методы экологической селекции растений с применением биотехнологии для создания высокопродуктивных, экологически стабильных сортов, предложены соответствующие алгоритмы и компьютерные программы [7, 8]. В соавторстве с российскими коллегами из Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева им также написан ряд учебников по применению биометрии в селекционном процессе [9, 10]. В настоящее время этот подход развивается им и его учениками также в лаборатории экологической генетики и биотехнологии Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

ных и поэтому не включают блока генетико-статистического анализа, учитывающего специфику требований селекционера. В отличие от других программных биометрических продуктов того периода, таких как DAVEP-PC (Германия), БИОСТАТ (Молдова) [9], пакет РИШОН ориентирован на запросы генетиков и селекционеров, в первую очередь растениеводов, уступая только более позднему российскому программному продукту AGROS [14].

Непосредственная нацеленность на генетику сельскохозяйственных растений позволила внедрить пакет в практику учебного и научно-исследовательского процессов на биологическом факультете Гомельского государственного университета, ряде кафедр Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. Пакет был также передан для использования на Опытную станцию по птицеводству НАН Беларуси, в Институт генетики и физиологии хлопчатника АН Таджикистана и др.

Однако за 10 прошедших лет дизайн пакетов АБ-Стат и РИШОН, ориентированный на MS DOS, морально устарел. Многие программы из этих пакетов не работают даже в среде Windows 95–98 и ХТ, не говоря уже о Windows 7. Назрела необходимость их перевода на более современную платформу. Учитывая опыт российских коллег, можно представить себе обновленный пакет в виде автоматизированного

рабочего места генетика-селекционера (АРМ «АГРОПЛАНТ»), соединяющего все преимущества как генетических, так и селекционных программ, базирующихся на биометрических моделях.

С середины 1990-х гг. д.б.н. С.Е. Дромашко разрабатывает теоретико-информационный подход к анализу генетических данных [15, 16] (в настоящее время совместно с к.б.н. Я.И. Шейко [17]). Эту наработку также имело бы смысл включить в новый пакет.

Кроме того, вызывают большой интерес и могут оказаться полезными для построения и верификации биометрических генетических моделей компьютерные программы статистического анализа данных, разрабатываемые под руководством члена-корреспондента Ю.С. Харина в НИИ прикладных проблем математики и информатики Белгосуниверситета [18]. В этом институте ведется создание математического и программного обеспечения в области робастного (устойчивого к искажениям модельных предположений) статистического анализа многомерных данных и временных рядов [19].

При биометрической обработке экспериментальных данных, как правило, а priori предполагается, что они подчиняются нормальному, или Гауссову распределению, что в биологии выполняется далеко не всегда [20, 21]. В этой связи следует напомнить работы д.б.н. О.О. Кедрова-Зихмана (лаборатория генетики озимой ржи Института генетики и цитологии НАН Беларуси), который много внимания уделял проверке нормальности распределений биологических данных. Он показал, что в значительном числе случаев наблюдается сильное отклонение от нормального распределения, что можно определить по величине статистических моментов порядка выше второго: коэффициентов эксцесса и асимметрии (в случае нормального распределения они равны 3 и 0 соответственно). Например, нельзя ожидать нормального распределения при создании синтетических гибридных популяций [22].

В развитие этих представлений нами создана программа BIODIS (BIOmetrical DIStribution) для персональных ЭВМ, предоставляющая биологам удобный в использовании инструмент для быстрой и надежной оценки вида распределения экспериментальных данных вне зависимости от их характера [23]. Про-

грамма позволяет сделать выбор между семью следующими распределениями: нормальное, биномиальное, Пуассона, t -распределение (Стьюдента), Максвелла, геометрическое, равномерное. При этом учитывается характер экспериментальных данных, т.е. величина выборки (больше или меньше 20 измерений в обрабатываемом массиве) и наличие так называемых «выбросов» (или грубых ошибок измерений), так что экспериментатор может задать соответствующий режим обработки. Для оценки достоверности гипотезы о виде распределения на выбор предлагаются три критерия: χ^2 , Колмогорова и ω^2 . При этом в программу встроены рекомендации по применению того или иного критерия согласия.

Таким образом, в программное обеспечение АРМ «АГРОПЛАНТ» будут входить как стандартные биометрические методы, так и специализированные программы генетико-статистического анализа, распределенные по следующим блокам:

- элементарная статистика: проверка характера распределения, определение необходимого размера выборки для альтернативного признака, первичная обработка генетико-селекционных данных, вычисление критериев Стьюдента и Фишера, сравнение распределений по критериям Манна-Уитни и хи-квадрат, робастные оценки сдвига и масштаба, разбиение по классам;
- корреляционный и регрессионный анализ: определение матрицы коэффициентов корреляции, полный корреляционный анализ, вычисление корреляционного отношения, нахождение линейных корреляций, вычисление корреляций по Спирмену, робастных коэффициентов корреляции, выбор уравнения регрессии, в том числе множественной линейной регрессии, определение нелинейной регрессии и др.;
- дисперсионный анализ: одно-, двух-, трехфакторный анализ, включая его вариации (план рандомизированных блоков, латинский квадрат (прямоугольник), расщепленные делянки и блоки и др.), дисперсионный анализ альтернативных признаков и многофакторный (до 6 факторов) дисперсионный анализ;
- многомерный анализ: построение дендрограммы, ковариационный анализ для повышения точности опыта, компонентный анализ,

разные виды кластерного анализа, подсчет матрицы расстояний Махаланобиса и др.;

- теоретико-информационный анализ: скрининг наиболее значимых факторов, определение информационных потоков и их силы, оптимизация многомерных взаимодействий в малых и уникальных выборках;
- генетический анализ: тесты масштабности Mather, объединенный тест Cavalli, двутестерный анализ по Perkins et al., тройной тест-кросс F_2 , вычисление общей и специфической комбинационной способности по Griffing, анализ комбинационной способности по Campthorn, анализ диаллельных скрещиваний по Nauman, определение экологической стабильности

и пластичности, вычисление путевых коэффициентов Райта, оценка кросс-корреляции, оценка генотипических и средовых корреляций, анализ сопряженной изменчивости, построение селекционных индексов и др.;

- селекционное планирование и анализ: двухкомпонентный метод планирования скрещиваний, коррекция по скользящей средней, анализ прибавки урожайности по Ильину, интегральная оценка селекционных номеров, анализ взаимодействия генотип-среда, включая оценку стабильности по Мартынову и вычисление эквалент по Wricke, и оценку пластичности сортов по Eberhart, Russel, учет пестроты почвенного плодородия и др.

Разработка методов анализа изображений растительных объектов

Ряд важных разработок под руководством к.с.-х.н. А.И. Ковалевича создан к.б.н. А.П. Кончицем в лаборатории лесной селекции и семеноводства Института леса НАН Беларуси. Среди них – оригинальный программно-технологический комплекс по компьютерной биометрии BioSom для оценки количественных признаков древесных растений на основе биометрического анализа изображений [24], база данных «Селекционный фонд лесных древесных пород Беларуси» [25] и др.

В частности, программно-технологический комплекс BioSom позволяет более подробно описать фенотипические признаки растений и может быть использован при проведении популяционно-генетических исследований. В его состав входит ряд функциональных блоков, позволяющих описать фенотипические признаки объектов, связанные с формой метамерных органов (BioShape), текстуры и окраски метамерных органов (BioTexture), формы, окраски и текстуры микроскопических

объектов (пыльцевых зерен, пыльцевых трубок, клеточных структур) (BioMicro); провести анализ крон деревьев, корневых систем, ветвей, семян (BioRoot), проанализировать приростные керны и определить ход роста деревьев (BioKern); дать количественное описание развития биологических объектов (BioMov).

В лаборатории хромосомной инженерии растений Института генетики и цитологии НАН Беларуси м.н.с. О.М. Люсиковым под руководством д.б.н. И.А. Гордея разработана компьютерная программа «Кариомастер», предназначенная для накопления, представления и анализа информации в области кариологии растений. Данная программа является универсальным средством автоматизированного анализа хромосомных наборов произвольного типа. Она реализует основные интерфейсные функции пользователя, необходимые для работы с базами данных и выполнения автоматического и полуавтоматического анализа объектов на изображении метафазной пластинки (рис. 1).

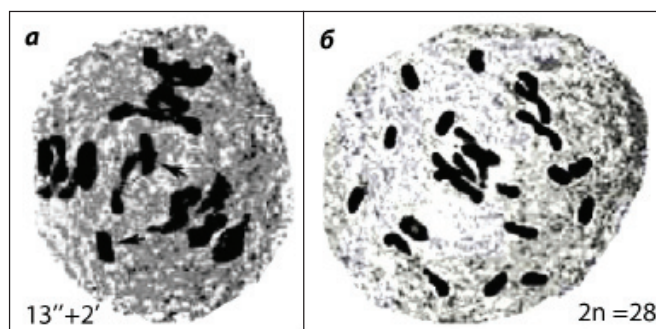


Рис. 1. Пример работы программы «Кариомастер»

Программа обеспечивает следующие функции:

- настройку процедуры анализа под любой хромосомный набор (кариотип);
- ввод изображения метафазной пластинки в компьютер;
- автоматическую сегментацию изображения с выделением изолированных объектов;
- автоматическую разметку выделенных объектов в предположении, что они являются хромосомами;
- ручной режим разметки изображения отдельной хромосомы и автоматический расчет ее морфометрических параметров;
- ручной режим объединения разорванных объектов и разделения слипшихся или перекрывающихся объектов;
- автоматическую классификацию хромосомы по рассчитанным морфометрическим параметрам;
- автоматическое построение кариограммы по размеченным объектам пластинки;
- возможность ручной классификации хромосом методом перетаскивания изображения хромосомы на ячейку кариограммы при помощи мыши;
- расчет статистических параметров хромосом по множеству метафазных пластинок с возможностью использования этих результатов для корректировки параметров эталонного кариотипа;
- сохранение результатов измерения в базе данных;
- возможность просмотра и редактирования данных, хранящихся в базе данных;
- возможность обмена данными с другими приложениями через системный буфер обмена;
- настройку параметров, внешнего вида программы и панелей, представляющих результаты измерений;
- предоставление пользователю пояснений и подсказок по работе с программой во всех режимах при помощи встроенной контекстной справочной системы.

В качестве особенностей данной программы следует также отметить удобную систему представления информации, записанной в базе данных, в форме древовидной структуры вложенных папок и страниц данных. Такая система делает наглядной организацию данных, упрощает работу с ними и дает возможность пользователю самому определять структуру представления данных. Еще одной особенностью программы является реализация так называемого плавающего интерфейса, который дает возможность перемещать, изменять размеры и прятать большинство элементов программного интерфейса. Это значительно расширило возможности настройки интерфейса в соответствии с запросами пользователя и аппаратурными ограничениями.

Медицинские приложения биоинформатики

Важным направлением биоинформатики является разработка методов и систем интеллектуального анализа данных и создания на этой основе информационных технологий поддержки принятия решений в биологии и медицине. В Объединенном институте проблем информатики НАН Беларуси этими проблемами занимается целый ряд лабораторий. В частности, здесь под руководством академика НАН Беларуси С.В. Абламейко и д.ф.м.н. А.В. Тузикова разработан ряд информационных систем и технологий, использующихся в медицине [26]:

- автоматизированная система управления медицинского учреждения, предназначенная для создания и управления информационными потоками сбора, анализа и обработки данных на основе ведения компьютерной медицинской карты стационарного (амбулаторного) больного, истории болезни и сопутствующих документов, обработки информации по ресурсному материально-техническому обеспечению;
- система НЕФРОН для поддержки распределенных баз данных, содержащих как графические данные (рентгенограммы, УЗИ, томограммы), так и сопровождающие их сведения о нефрологических больных в Республике Беларусь; дистанционного уточнения диагноза; прогнозирования состояния больных и выдачи рекомендаций по их дальнейшему лечению;
- система дифференциальной диагностики рака щитовидной железы по цитологическим изображениям.

В ряде учреждений Министерства здравоохранения Республики Беларусь ведутся исследования в области медицинского приложения

математического моделирования и биоинформатики – фактически разрабатываются АРМ врача-диагноста.

В области таких медицинских приложений биоинформатики следует назвать работы д.м.н. В.Н. Ростовцева (Белорусский центр медицинских технологий, информатики, уп-

равления и экономики здравоохранения) по созданию информационных систем для генетического анализа данных (ППС ОМЕГА и ПРАГ-ОЗФ). В последние годы им создан программно-аппаратный комплекс КМСД (комплекс медицинский спектрально-динамический) [27] (рис. 2).



Рис. 2. Программно-аппаратный диагностический комплекс КМСД

Комплекс позволяет оперативно проводить пассивную, без какого-либо воздействия на организм, диагностику:

- манифестных, латентных и предпатологических состояний и процессов по всем органам и системам организма пациента;
- предпатологии и рисков по всем органам и системам организма пациента;
- этиологических агентов: вирусов, бактерий, патогенных грибов, микропаразитов и гельминтов;
- экологических факторов: аллергенов, токсикантов, физических факторов и продуктов питания;
- индивидуального соответствия организму пациента лечебно-профилактических средств: аллопатических лекарственных средств, фитопрепаратов, биологически активных добавок, изопатических и гомеопатических препаратов.

КМСД и реализованная в нем технология получили высокую оценку специалистов, а также положительные отзывы на V Форуме проектов Союзного государства.

В РНПЦ «Мать и дитя» (д.м.н. Е.Г. Ильина) в сотрудничестве с Белорусским государственным университетом информатики и радиоэлектроники (к.т.н. С.В. Колосов) ведутся

работы по созданию компьютерных средств диагностики в клинической генетике (программа SynDiag и др.). В частности, SynDiag (версия 4.2) является диагностической программой, работающей под операционными системами семейства Windows (98–2000 (NT)–XP) [28]. Программа SynDiag предназначена для диагностики:

- МСА/MR синдромов, т.е. синдромов множественных врожденных аномалий/психической отсталости, различной этиологии (моногенной, хромосомной, тератогенной и т.д.);
- эктодермальных и скелетных дисплазий;
- некоторых системных аномалий.

Программа также может быть использована в качестве учебника по синдромологии и предназначена для любого врача, который в своей практике сталкивался с пациентами с нарушениями развития.

В НИИ прикладных проблем математики и информатики Белгосуниверситета ведется разработка математического и программного обеспечения медицинской диагностики. В частности, в НИЛ статистического анализа и моделирования разработан и внедрен в онкодиспансерах Министерства здравоохранения Республики Беларусь программный ком-

плекс диагностики злокачественных опухолей основных локализаций с использованием робастных статистических решающих правил, а также компьютерная система диагностики метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у больных меланомой кожи [29].

В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси к.б.н. О.В. Квитко, к.б.н. Я.И. Шейко и к.б.н. И.И. Конево (лаборатория моделирования генетических процессов) разработаны оборудование и технология долговременной компьютерной видеомикроскопии живых клеток [30–32]. Компьютерная система для видеонаблюдения живых клеток состоит из инвертированного микроскопа с присоединенной видеокамерой, которая подключена к компьютеру. Для видеозаписи и анализа полученных видеопленок наряду со стандартным программным обеспечением, используются оригинальные компьютерные программы, разработанные к.б.н. Я.И. Шейко.

С использованием витальной компьютерной видеозаписи микроскопических изображений клеточных культур *in vitro* получена серия видеопленок, демонстрирующих процесс

формирования индивидуального клеточного клона на протяжении ряда последовательных митотических делений. Анализ полученной родословной позволил изучить на уровне единичных клеток и их потомства процесс формирования гетерогенности клеток в предраковой (иммортизированной) клеточной линии фибробластов мыши.

На основе предложенного ими прототипа в рамках ГНТП «Эталонные и научные приборы» ГНПО «Планар» (НТЦ «Микроскопия» – структурное подразделение ОАО «Оптоэлектронные системы») совместно с академическими Институтами генетики и цитологии и тепло- и массообмена создан автоматизированный комплекс «Цитомир», способный обеспечить многократное компьютерное фотографирование многих (до нескольких сотен) различных участков ростовой поверхности долговременных клеточных культур (рис. 3). Видеокомплекс «Цитомир» обладает экономическим эффектом по импортозамещению 150 тысяч евро, а также имеет значительный экспортный потенциал, что позволяет рекомендовать его к серийному производству.



Рис. 3. Компьютерный видеокомплекс «Цитомир» для изучения живых клеток

С помощью технологии компьютерной видеомикроскопии в 2011–2012 гг. удалось подтвердить данные начала 1990-х гг. об антираковом эффекте ДНК, выделенной из эритроцитов цыпленка [33]. В свете явления РНК-интерференции это открывает новые перспективы в разработке методов онкотерапии с использованием специфических олигонуклеотидов [34].

Говоря о нейроинформатике – науке, изучающей нейроподобные способы обработки информации при помощи компьютеров, необходимо сказать, что в Объединенном институте проблем информатики НАН Беларуси работает лаборатория биоинформатики (к.т.н. И.Э. Том), одним из направлений исследований которой является развитие интеллектуальных методов обработки и анализа дан-

ных, основанное на нейросетевых моделях [35]. В лаборатории идентификации систем (д.т.н. Р.Х. Садыхов) ОИПИ разрабатываются

методы и алгоритмы обучения нейронных сетей в задачах распознавания и управления [36].

Создание информационных ресурсов и компьютерных программ в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси

С 2005 г. в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси большое внимание уделяется созданию информационных ресурсов. Всего их насчитывается уже свыше 40, в том числе:

- Электронная энциклопедия по генетике (академик Н.А. Картель, д.б.н. С.Е. Дромашко, к.б.н. Е.Н. Макеева и др., 2005);
- Системы «Маркёр» и «Бета-гал» (к.б.н. Я.И. Шейко, 2006);
- Веб-сайт, посвященный изучению клеточного старения (к.б.н. Я.И. Шейко, к.б.н. О.В. Квитко, к.б.н. И.И. Конева, 2007);
- База данных «Генетический полиморфизм популяций этнических белорусов» (к.б.н. Л.Н. Сивицкая, к.б.н. Е.И. Кушнеревич, к.б.н. Н.Г. Даниленко и др., 2008);
- База данных морфологических признаков у отдаленных гибридов F_1-F_2 от скрещивания сортов мягкой пшеницы с дикорастущими видами трибы *Triticeae* (к.б.н. Л.В. Корень, к.б.н. О.А. Орловская, академик Л.В. Хотылева, 2009);
- База данных анатомических и физико-химических маркеров качества льноволокна селекционных образцов льна-

долгунца (Т.В. Никитинская, В.Н. Леонтьев, д.б.н. В.В. Титок, 2009);

- Справочно-информационная система для молекулярно-генетической паспортизации карпа (д.б.н. С.Е. Дромашко, к.б.н. Я.И. Шейко, О.Ю. Конева, 2010);
- База данных «Генетическая коллекция тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов» (к.б.н. Н.И. Дубовец, к.б.н. Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич, 2010);
- Электронный ресурс «Генетический мониторинг на примере популяций моллюсков *Lymnaea stagnalis* из регионов с различной экологической нагрузкой» (О.Ю. Конева, 2012) и многие другие.

В 2012 г. началась регистрация таких объектов интеллектуальной собственности, как компьютерные программы. Национальным центром интеллектуальной собственности уже выданы свидетельства на 3 программы (диагностика митохондриальных синдромов “Belmitocombat”, к.б.н. Н.Г. Даниленко и др., обработка данных компьютерной видеомикроскопии «Маркёр» и “Stain”, к.б.н. Я.И. Шейко).

Заключение

Математическая биология и биоинформатика относятся к числу высоких технологий современной биологии, биомедицины и биотехнологии, обеспечивая информационно-компьютерные и теоретико-математические основы генетики и селекции, молекулярной биологии, генетической и белковой инженерии, медицинской генетики, нейробиологии, иммунологии и эпидемиологии, популяционной биологии и экологии [37].

В ряде учреждений Беларуси ведутся исследования в этом направлении, имеются высококвалифицированные специалисты и соответствующие научные подразделения, но нет объединяющего или координирующего центра. В БГУ кафедрой биофизики физического факультета ведется чтение ряда предметов (компьютерный эксперимент в биофизике,

генетическая инженерия, протеомика, биофизика сложных систем, нанобиотехнологии, клеточная информатика и др.) [38], имеющих непосредственное отношение к математической биологии и биоинформатике, но специалистов этого профиля официально в стране не готовят. Не существует и ученого совета, в котором можно было бы защитить диссертацию по специальности «Математическая биология, биоинформатика», до сих пор не разработан ее паспорт, хотя в Номенклатуре специальностей научных работников Республики Беларусь она значится под шифром 03.01.09 (физико-математические, биологические и медицинские науки) [39]. В республике отсутствуют учебники и учебные пособия по этой дисциплине, первая и пока единственная монография появилась только в 2009 г. [40], и охватывает она преимущественно

биологические и медицинские аспекты, т.е. не способна дать полноценную информацию для соискателей степени кандидата физико-математических наук.

Справедливости ради надо сказать, что недавно генеральный директор Объединенного института проблем информатики НАН Беларуси д.ф.-м.н. А.В. Тузиков выступил с предложением создать рабочую группу по подготов-

ке паспорта этой специальности и программы экзамена кандидатского минимума. Если к этому добавить еще и подготовку соответствующего учебного пособия, можно было бы высказать уверенность, что опыт и достижения белорусских ученых в области математического моделирования и информационных технологий будут реализованы и страна сможет занять достойное место в современной биотехнологии.

Список использованных источников

1. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Минск: Вышэйшая школа, 1973. – 319 с.
2. Рокицкий, П.Ф. Введение в статистическую генетику / П.Ф. Рокицкий. – Минск: Вышэйшая школа, 1974. – 448 с.
3. Савченко, В.К. Генетика полиплоидных популяций / В.К. Савченко. – Минск: Наука и техника, 1976. – 240 с.
4. Савченко, В.К. Генетический анализ в сетевых пробных скрещиваниях / В.К. Савченко. – Минск: Наука и техника, 1984. – 223 с.
5. Турбин, Н.В. Диаллельный анализ в селекции растений / Н.В. Турбин, Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина. – Минск: Наука и техника, 1974. – 181 с.
6. Хотылева, Л.В. Взаимодействие генотипа и среды / Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина. – Минск: Наука и техника, 1982. – 109 с.
7. Кильчевский, А.В. Генотип и среда в селекции растений / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Наука и техника, 1989. – 191 с.
8. Кильчевский, А.В. Экологическая генетика растений / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Тэхналогія, 1997. – 372 с.
9. Смиряев, А.В. Биометрия в генетике и селекции растений / А.В. Смиряев, С.П. Мартынов, А.В. Кильчевский. – М.: Изд-во МСХА, 1992. – 269 с.
10. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский. – М.: КолосС, 2007. – 269 с.
11. Аношенко, Б.Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б.Ю. Аношенко // Генетика. – 1994. – Т. 30 (прил.). – С. 8–9.
12. Дромашко, С.Е. О логической схеме и структуре пакета прикладных программ по генетико-статистическим расчетам / С.Е. Дромашко, С.Р. Мац, Г.И. Френкель // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 9. – С. 1314–1316.
13. Дромашко, С.Е. Пакет прикладных генетико-статистических программ для персональных ЭВМ РИШОН: пути совершенствования / С.Е. Дромашко, О.М. Пятковская, Е.М. Клевченя // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. – 1997. – № 1. – С. 67–70.
14. Мартынов, С.П. Статистический и биометрико-генетический анализ в растениеводстве и селекции. Пакет программ AGROS, версия 2.09.: руководство пользователя / С.П. Мартынов. – Тверь, 1999. – 90 с.
15. Дромашко, С.Е. О возможности исследования генетических систем с помощью информационно-логического подхода / С.Е. Дромашко, Г.И. Френкель, Б.О. Дубовской // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 1. – С. 139–143.
16. Дромашко, С.Е. Теоретико-информационный анализ генетических процессов. Новая компьютерная программа в формализме Excel / С.Е. Дромашко, А.В. Машиц // Генетика и селекция в XXI веке. – Минск, 2002. – С. 364–365.
17. Дромашко, С.Е. Разработка метода компьютерного анализа данных на основе теоретико-информационного формализма / С.Е. Дромашко, Я.И. Шейко // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. научн. конф.; 8-й съезд Бел. обществ. об-ния фотобиол. и биофиз., 25–27 июня 2008 г., Минск, Беларусь: сб. статей. – Минск: Изд. центр БГУ, 2008. – Ч. II. С. 292–294.
18. НИИ прикладных проблем математики и информатики БГУ [Электрон.

- ресурс] / Белорусский государственный университет. – Режим доступа: <http://www.bsu.by/ru/main.aspx?guid=7281>. – Дата доступа: 27.11.2012.
19. Математическая и прикладная статистика [Электрон. ресурс] / НИИ прикладных проблем математики и информатики БГУ. – Режим доступа: <http://apmi.bsu.by/research/statistics.html>. – Дата доступа: 27.11.2012.
20. Реброва, О.Ю. Описание процедуры и результатов статистического анализа медицинских данных в научных публикациях. Часть I. Описание статистического анализа в разделе «Материалы и методы». Представление данных в разделе «Результаты» / О.Ю. Реброва // Международный журнал медицинской практики. – 2000. – № 4. – С. 43–46.
21. Леонов, В. Логистическая регрессия в медицине и биологии / В. Леонов // Биометрика – журнал для медиков и биологов, сторонников доказательной медицины [Электрон. ресурс]. – Режим доступа: http://www.biometrika.tomsk.ru/logit_1.htm. – Дата доступа: 27.11.2012.
22. Кедров-Зихман, О.О. Поликросс-тест в селекции растений / О.О. Кедров-Зихман. – Минск: Наука и техника, 1974. – 128 с.
23. Дромашко, С.Е. Новая компьютерная программа для подбора вида распределения биологических данных / С.Е. Дромашко, О.М. Громько // Весці НАН Беларусі, сер. біял. навук. – 1999. – № 1. – С. 28–30.
24. Ковалевич, А.И. Программно-технологический комплекс компьютерной биометрии BioCom и результаты его опытной эксплуатации / А.И. Ковалевич, А.П. Кончиц // Трансграничное сотрудничество в области охраны окружающей среды: состояние и перспективы развития: материалы международной научно-практической конференции. – Гомель, 2006. – С. 316–320.
25. Кончиц, А.П. База данных по учету селекционно-генетических ресурсов лесных древесных пород / А.П. Кончиц, А.И. Ковалевич, Е.И. Сукач // Леса Беларуси и их рациональное использование: Международная научно-техническая конференция. – Минск, 2000. – С. 19–21.
26. Разработки ОИПИ НАН Беларуси [Электрон. ресурс] / Объединенный институт проблем информатики. – Режим доступа: http://uiip.bas-net.by/work/dev_uiip/index.php. – Дата доступа: 27.11.2012.
27. Комплекс медицинский спектрально-динамический [Электрон. ресурс]. – Режим доступа: <http://www.kmsd.su/about/annotation/>. – Дата доступа: 27.11.2012.
28. SynDiag is the best syndromal diagnosis computer program [Электрон. ресурс]. – Режим доступа: <http://kolosov.tripod.com/>. – Дата доступа: 27.11.2012.
29. НИИ статистического анализа и моделирования [Электрон. ресурс]. / НИИ прикладных проблем математики и информатики БГУ. – Режим доступа: <http://apmi.bsu.by/structure/stam.html>. – Дата доступа: 27.11.2012.
30. Анализ пролиферации и дифференцировки нормальных (стареющих) фибробластов человека и мыши с помощью прижизненной видеомикроскопии / Я.И. Шейко [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2002. – Т. 46, № 1. – С. 90–94.
31. 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.
32. Time-lapse microscopy of living cells *in vitro* / O.V. Kvitko [et al.] // Proceedings of the International Conference “Optical Techniques and Nanotools for Material and Life Sciences”. – Minsk, 2010. – Vol. 2. – P. 220–223.
33. Квитко, О.В. Антираковый эффект экзогенных нуклеиновых кислот / О.В. Квитко, Л.Н. Жукова, И.И. Конева // Доклады АН Беларуси. – 1992. – Т. 36, № 7–8. – С. 652–655.
34. Биологические эффекты экзогенных полинуклеотидов и перспективы их использования в медицине (обзорная статья) / О.В. Квитко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. – 2012. – Т. 13. – С. 126–135.
35. Лаборатория биоинформатики [Электрон. ресурс] / Объединенный институт проблем информатики. – Режим доступа: http://uiip.bas-net.by/structure/l_bi/index.php. – Дата доступа: 27.11.2012.
36. Лаборатория идентификации систем [Электрон. ресурс] / Объединенный институт проблем информатики. – Режим доступа: http://uiip.bas-net.by/structure/l_is/index.php. – Дата доступа: 27.11.2012.

37. Институт математических проблем биологии РАН [Электрон. ресурс] / Пушинский научный центр РАН. – Режим доступа: http://www.psn.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=55&Itemid=60. – Дата доступа: 27.11.2012.

38. Кафедра биофизики [Электрон. ресурс] / Официальный сайт Физического факультета Белорусского государственного университета. – Режим доступа: <http://www.physics.bsu.by/biophys/index.html>. – Дата

доступа: 27.11.2012.

39. Номенклатура специальностей научных работников Республики Беларусь [Электрон. ресурс] / Высшая аттестационная комиссия Республики Беларусь. – Режим доступа: <http://www.vak.org.by/index.php?go=Pages&in=view&id=102>. – Дата доступа: 27.11.2012.

40. Дромашко, С.Е. Очерки биоинформатики / С.Е. Дромашко. – Минск: Беларуская навука, 2009. – 400 с.

Дата поступления статьи 30 ноября 2012 г.

КОНЪЮГАЦИОННЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ ДЕГРАДАЦИИ СИМАЗИНА *HERBASPIRILLUM HUTTIENSE* B601 В РОДСТВЕННЫЕ БАКТЕРИИ

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

Введение

Хлорированные симм-триазиновые гербициды (симазин, атразин, пропазин) десятилетиями использовались в борьбе с сорняками на посевах кукурузы, ряда полевых и овощных культур. Широкое применение хлорированных симм-триазинов в практике интенсивного земледелия привело к их накоплению в обрабатываемых почвах, затруднив или сделав невозможным чередование культур [1]. Длительное использование этих гербицидов приводит к их проникновению в грунтовые воды [2]. Перспективный подход для восстановления загрязненных почв — применение биопрепаратов на основе микроорганизмов, осуществляющих минерализацию симм-триазинов, в том числе -рекомбинантных штаммов-деструкторов [3].

Ранее из ризосферы кукурузы нами была изолирована бактерия *Herbaspirillum huttense* B601, способная к деградации симм-триазиновых гербицидов благодаря присут-

ствию генов *smzA*, *-B* и *-C*, локализованных на крупной плазмиде и гомологичных соответственно генам *atzA*, *-B*, и *-C* из *Pseudomonas* sp. ADP [4]. Известно, что плаزمида утилизации атразина бактерии *Pseudomonas* sp. ADP легко переносится и экспрессируется в *E. coli* [5], а ключевые гены его деградации у различных бактерий обладают высокой степенью сходства [6]. Гены *smzA*, *-B* и *-C* при конъюгации передаются из штамма B601 в его Smz⁺ производные как за счет мобилизации второй резидентной плазмидой меньшего размера, так и с помощью плазмиды pSa [7,8]. Тем не менее, перенос способности утилизировать симазин из *H. huttense* B601 в неродственные грамотрицательные бактерии оказался затруднительным [9]. Целью данной работы было исследование закономерностей конъюгационного переноса *smz* генов *H. huttense* B601 в бактерии других видов рода *Herbaspirillum*.

Материалы и методы

При проведении скрещиваний в качестве донора использовали минерализующую симазин бактерию *Herbaspirillum huttense* B601 (дикий тип), в качестве реципиентов — спонтанные устойчивые к рифампицину (Rif^r) мутанты штаммов *Herbaspirillum huttense* DSM 10281^T, *Herbaspirillum seropedicae* A95, *Herbaspirillum seropedicae* A57, *Herbaspirillum seropopodicae* SmcI [10] и *Herbaspirillum frisingense* B416 [11].

Культуры бактерий рода *Herbaspirillum* выращивали в среде ТУ (триптон — 10 г/л, дрожжевой экстракт — 1 г/л, CaCl₂ — 0,2 г/л, pH 7,0) или S (глюкоза — 4 г/л, симазин — 0,5 г/л, K₂HPO₄ — 0,5 г/л, MgSO₄·7H₂O — 0,2 г/л, CaCl₂ — 0,02 г/л, pH 7,3–7,5) при 28°C. Для получения твердых сред использовали бактериологический агар Difco (15 г/л) или аналогичного качества.

Скрещивания проводили на твердой среде ТУ. Смешивали свежие суточные культуры

донора и реципиента в логарифмической фазе роста в соотношении 1:10 и 50 мкл смеси переносили на стерильный фильтр Millipore ($\sigma \approx 0,2\mu$), помещенный на поверхность среды. После инкубирования чашек при 28 °C в течение ночи бактерии с фильтров смывали 0,1 М раствором MgSO₄. Для отбора трансконъюгантов полученную суспензию и ее последовательные разведения высевали на селективную среду S с добавлением 50 мкг/мл рифампицина.

Идентификацию плазмид осуществляли по модифицированной методике Экхардта [12]. Очищенную ДНК плазмид получали путем ее вырезания из 0,7% агарозного геля и дальнейшей экстракции с помощью GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Присутствие генов деградации симазина в плазмидной ДНК обнаруживали с помощью ПЦР, используя предложенные de Souza специ-

фичные праймеры [6]. Нуклеотидные последовательности, обладающие сходством с геном *pilA* из *Pseudomonas putida* WCS358 [13] обнаруживали с помощью ПЦР, используя праймеры *pilAf* (5' TCACCCTGATCGAACTGATG 3'), *pilA-1r* (5' GGTGCAGCCCCACCC 3') и *pilA-3r* (5' ATGGCTGTCTTCAGCGC 3').

Реакционная смесь (30 мкл) содержала 3 мкл 10X буфера (Диалат Ltd., Россия), 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, по 60 пкмоль каждого из пары праймеров, 1 единицу BioTaq-полимеразы (Диалат Ltd., Россия) и 10 нг очищенной ДНК плазмид в качестве матрицы.

ПЦР проводили в термоциклере MJ Mini™ ("Bio-Rad") по следующей схеме: первичная

денатурация – 95 °С в течение 4 минут; затем 30 циклов, состоящих из инкубаций: 95 °С – 30 секунд, 55 °С (65 °С при амплификации *smzB*) – 30 секунд, 72 °С – 2 минуты; и завершающая элонгация – 72 °С в течение 10 минут. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,2% агарозном геле.

Генетическое типирование бактерий осуществляли с помощью ERIC-ПЦР, придерживаясь ранее изложенной нами методики [11].

Элиминацию Smz^+ фенотипа при росте культур трансконъюгантов в бульоне ГУ определяли высевом на агар S. Smz^- колонии отличались меньшими размерами и отсутствием зоны растворения суспензии симазина.

Результаты и обсуждение

В скрещиваниях между Smz^+ штаммом *H. huttiense* B601 и Rif^r мутантами бактерий рода *Herbaspirillum* Smz^+Rif^r трансконъюганты выявлялись лишь при использовании в качестве реципиента штамма *H. huttiense* DSM 10281^T. Частота переноса способности утилизировать симазин при этом составляла около 10^{-6} на клетку реципиента. Возникновение спонтанных Rif^r мутантов донора наблюдали с частотой около 10^{-8} , что в 100 раз меньше

частоты появления колоний Smz^+Rif^r трансконъюгантов, морфологически неотличимых от колоний донора. В результате генотипирования с помощью ERIC-ПЦР было установлено, что фингерпринты всех проверенных Smz^+Rif^r бактерий и реципиента полностью совпадали, но отличались от фингерпринтов донора присутствием дополнительного дифференцирующего единичного фрагмента размером около 1000 п.н. (рис. 1).

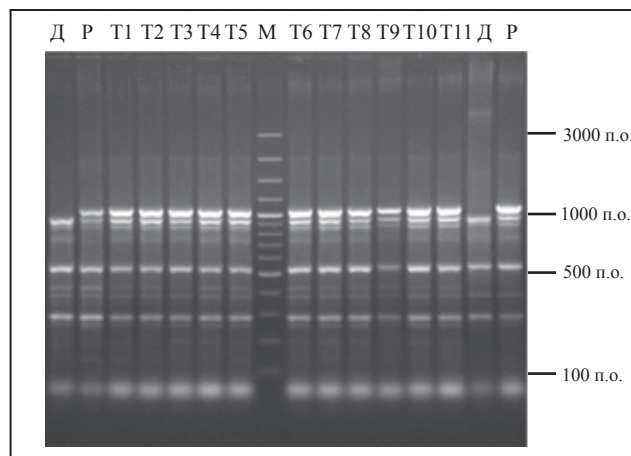


Рис. 1. Генотипирование штаммов *H. huttiense* DSM 10281^T (Р), *H. huttiense* B601 (Д) и Smz^+Rif^r трансконъюгантов (Т1-Т11) с помощью ERIC-ПЦР

Дорожки: Д – донор *H. huttiense* B601; Р – реципиент *H. huttiense* DSM 10281^T; Т1-Т10 – Smz^+Rif^r трансконъюганты. Резидентные плазмиды донора: Smz – плазида деградации симазина (210 т.п.н.); R2 – трансмиссивная плазида (60 т.п.н.). М – маркер молекулярной массы - Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва).

При идентификации плазмид у всех Smz^+Rif^r трансконъюгантов выявлялась крупная плазида размером около 210 т.п.н., что соответствовало размеру Smz плазмиды донора

(рис.2). При этом в геноме реципиента присутствия плазмид обнаружено не было, а у донора выявлялись обе характерные для него плазмиды [7].

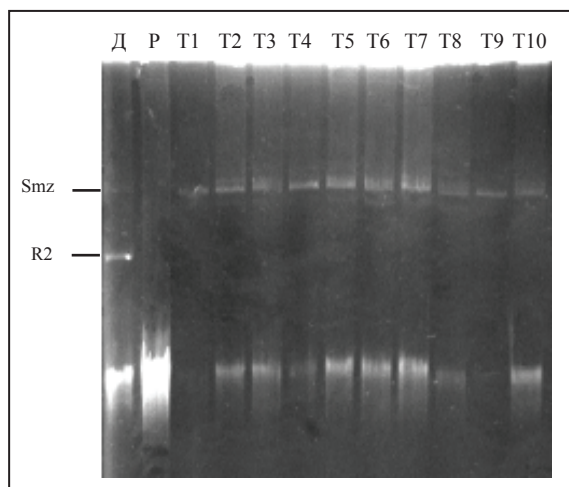


Рис. 2. Идентификация плазмидной ДНК родительских штаммов и трансконъюгантов
Дорожки: Д – донор *H. huttiense* B601; Р – реципиент *H. huttiense* DSM 10281^T; T1–T10 – Smz⁺ Rif^r трансконъюганты. Резидентные плазмиды донора: Smz – плазида деградации симазина (210 т.п.н.); R2 – трансмиссивная плазида (60 т.п.н.).

В результате проведения геноспецифичной ПЦР амплификация всех трех фрагментов, соответствующих центральным областям генов *atzA*, *-B* и *-C*, происходила лишь при использовании в качестве матрицы ДНК плазмид Smz⁺ Rif^r трансконъюгантов либо Smz

плазмиды донора *H. huttiense* B601 (рис. 3). Таким образом, появление у трансконъюгантов способности к утилизации симазина в качестве единственного источника азота было обусловлено переносом плазмиды, несущей все три ключевые гены его деградации.

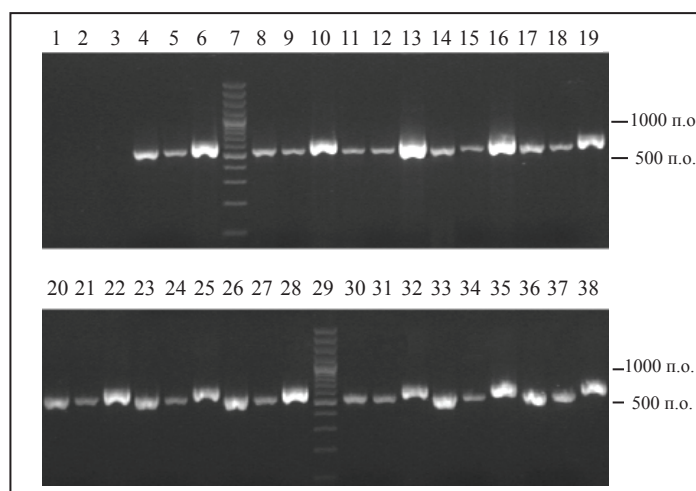


Рис. 3. Обнаружение генов деградации симазина в плазмидной ДНК с помощью ПЦР
В качестве матрицы для ПЦР использовали: ДНК плазмид R2 (дорожки 1–3) и Smz донора *H. huttiense* B601 (дорожки 4–5), ДНК плазмиды Smz⁺ трансконъюгантов T1 (дорожки 8–10), T2 (дорожки 11–13), T3 (дорожки 14–16), T4 (дорожки 17–19), T5 (дорожки 20–22), T6 (дорожки 23–25), T7 (дорожки 26–28), T8 (дорожки 30–32), T9 (дорожки 33–35), T10 (дорожки 36–38). Для анализа использовали специфичные праймеры к генам *smzA* (дорожки 1, 4, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 33, 36), *smzB* (дорожки 2, 5, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 31, 34, 37), *smzC* (дорожки 3, 6, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 32, 35, 38). Дорожки 7 и 29 – маркер молекулярной массы – Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва).

При росте в среде с легко доступными источниками азота Smz⁺ Rif^r трансконъюганты штамма *H. huttiense* 10281^T теряли способ-

ность утилизировать симазин с частотой около 5–6% за пассаж, что в 3–5 раз превышало частоту спонтанной элиминации этого признака

у бактерии *H. huttiense* B601 дикого типа [4, 7].

Электрофоретический анализ независимых Smz⁻ производных трансконъюгантов штамма *H. huttiense* 10281^T установил, что у всех исследованных штаммов потеря способности к утилизации симазина сопровождалась уменьшением размера приобретенной плаз-

миды, выраженным в различной степени (рис. 4). У двух из шестнадцати проанализированных Smz⁻ производных размер уменьшенной приобретенной плазмиды соответствовал размеру трансмиссивной плазмиды донорного штамма *H. huttiense* B601 (рис. 4, дорожки Э5, Э6).

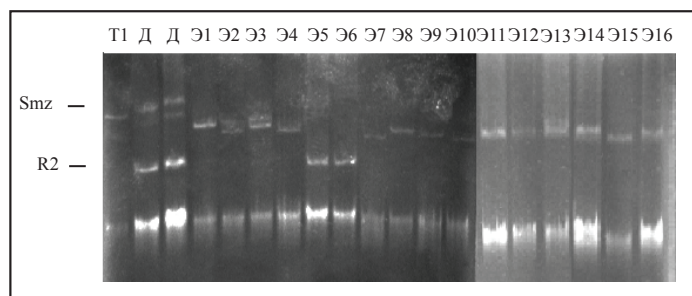


Рис. 4. Идентификация плазмидной ДНК Smz⁻ производных Smz⁺ Rif^r трансконъюгантов *H. huttiense* DSM 10281^T

T1 – Smz⁺ Rif^r трансконъюгант штамма *H. huttiense* DSM 10281^T; D – донор *H. huttiense* B601; Э1–Э16 – Smz⁻ спонтанные производные Smz⁺Rif^r трансконъюгантов. Резидентные плазмиды донора: Smz – плазида деградации симазина (210 т.п.н.); R2- трансмиссивная плазида (60 т.п.н.).

Уменьшение размера приобретенных плазмид свидетельствовало о том, что наиболее вероятной причиной утраты способности утилизировать симазин у Smz⁻ производных трансконъюгантов штамма *H. huttiense* DSM 10281^T являлась делеция фрагмента, несущего гены утилизации симазина. Для проверки данного предположения провели сравнительный ПЦР-анализ ДНК плазмид с использованием праймеров, позволяющих избирательно амплифицировать центральные участки генов деградации симазина *smzA*, *-B* или *-C*.

При использовании в качестве матрицы ДНК наименьших по размеру плазмид Smz⁻ производных Э5 и Э7 не было обнаружено амплификации фрагментов генов *smzA*, *-B* или *-C*, что свидетельствует об их сцепленной утрате (рис. 5, дорожки 7–12). В то же время, делеция в плазмиде штамма Э1 привела к утрате генов *smzA* и *-C*, но не затронула ген *smzB* (дорожки 4–6). В плазмиде штамма Э14 отсутствовал ген *smzA*, но сохранились *smzB* и *-C*, а в плазмиде штамма Э15 были утрачены гены *smzB* и *-C* но сохранился *smzA*.

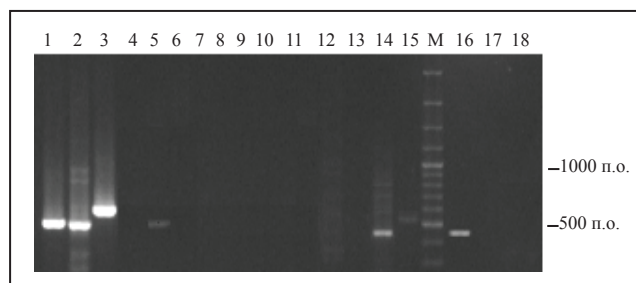


Рис. 5. Обнаружение генов деградации симазина в ДНК плазмид Smz⁻ производных Smz⁺ Rif^r трансконъюгантов штамма *H. huttiense* DSM 10281^T

В качестве матрицы для ПЦР использовали: ДНК плазмиды Smz донора *H. huttiense* B601 (дорожки 1–3) и плазмид Smz производных Smz⁺ Rif^r трансконъюгантов Э1 (дорожки 4–6), Э5 (дорожки 7–9), Э7 (дорожки 10–12), Э14 (дорожки 13–15) и Э15 (дорожки 16–18). Для анализа использовали специфичные праймеры к генам *smzA* (дорожки 1, 4, 7, 10, 13, 16), *smzB* (дорожки 2, 5, 8, 11, 14, 17), *smzC* (дорожки 3, 6, 9, 12, 15, 18). M – маркер молекулярной массы – Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва). т.п.н.).

Обнаружение у части Smz⁻ производных трансконъюгантов плазмиды размером около 60 т.п.н. указывало на возможность участия меньшей резидентной плазмиды *H. huttienne* B601, имеющей тот же размер, в мобилизации генов деградации симазина в *H. huttienne* DSM 10281^T так же, как это было ранее обнаружено при их переносе в Smz⁻ производные самого штамма B601 [4, 7]. Ранее с помощью блот-анализа было установлено, что эта плазида имеет участки, гибридизующиеся с геном *pilA* из *P. putida* WCS358 [4, 7], что дает возможность

ее обнаружения в составе гибридных плазмид.

При проведении ПЦР со специфичными к гену *pilA* праймерами образование характерных продуктов происходило при использовании в качестве матриц экстрагированной из агарозного геля ДНК меньшей плазмиды бактерии *H. huttienne* B601, плазмид Smz⁺ Rif^r трансконъюгантов штамма *H. huttienne* DSM 10281^T и их Smz⁻ производных Э5 и Э6. (рис. 6). При использовании в качестве матрицы ДНК крупной Smz плазмиды штамма *H. huttienne* B601 продукты реакции выявлены не были.

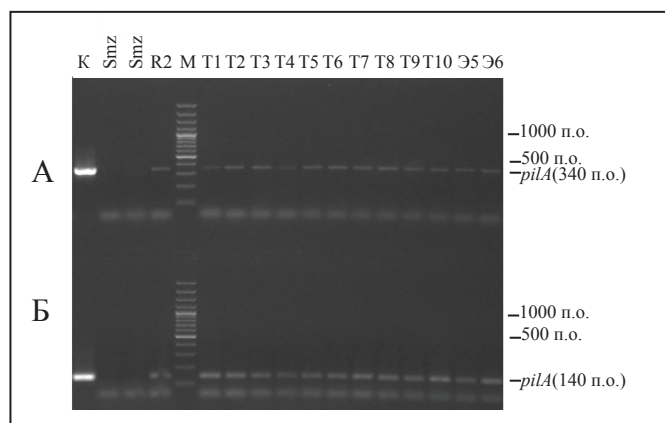


Рис. 6. Обнаружение присутствия в плазмидной ДНК нуклеотидных последовательностей, обладающих сходством с геном *pilA* из *P. putida* WCS358, с помощью ПЦР

В качестве матрицы для ПЦР использовали: ДНК плазмиды pAG2, несущей ген *pilA* из *P. putida* WCS358 (К); ДНК резидентной Smz плазмиды штамма *H. huttienne* B601 (Smz); ДНК резидентной трансмиссивной плазмиды (60 т.п.н.) штамма *H. huttienne* (R2); ДНК плазмид Smz⁺ Rif^r трансконъюгантов штамма *H. huttienne* DSM 10281^T (T1–T10); ДНК плазмид спонтанных Smz⁻ производных Smz⁺ Rif^r трансконъюгантов штамма *H. huttienne* DSM 10281^T (Э5, Э6).

Для анализа использовали специфичные праймеры к гену *pilA* из *P. putida* WCS358: pilAf и pilA-1r (А) или pilAf и pilA-3r (Б).

Таким образом, хотя плазмиды Smz⁺ Rif^r трансконъюгантов штамма *H. huttienne* DSM 10281^T сходны по размеру между собой и с Smz плазмидой донорного штамма *H. huttienne* B601,

перенос генов деградации симазина в *H. huttienne* DSM 10281^T при конъюгации обусловлен не переносом Smz плазмиды, а их мобилизацией второй резидентной плазмидой донора.

Заключение

Установлено, что способность использовать симазин в качестве единственного источника азота передается при конъюгации из бактерии *H. huttienne* B601 в типовой штамм вида *H. huttienne* DSM 10281^T с частотой около 10⁻⁶ на клетку реципиента. Не удалось обнаружить передачи способности катаболизировать симазин из *H. huttienne* B601 в бактерии, принадлежащие к родственным видам *H. frisingense*

и *H. seropedicae*. Так же как и в скрещиваниях с Smz⁻ производными самого штамма *H. huttienne* B601 [4,7] способность к утилизации симазина передавалась в *H. huttienne* DSM 10281^T не вследствие самостоятельного переноса крупной Smz плазмиды донора, а за счет мобилизации расположенных на ней генов деградации *smzA*, *-B* и *-C* второй резидентной плазмидой.

Список использованных источников

1. Коляда, Т.И. Токсическое последствие симазина и атразина на сельскохозяйственные культуры / Т.И. Коляда, Н.И. Туренков, И.А. Добровольская // Почвоведение и агрохимия.
2. Chemical Contamination of California Drinking Water / Н.Н. Russell [et al.] // The Western Journal of Medicine. – 1987. – V. 147. – P. 615–622.
3. Field-scale remediation of atrazine contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase / L.S. Strong [et al.] // Environ. Microbiol. – 1999. – № 2 – P. 91–98.
4. Бажанов, Д.П. Плазмидная локализация генов деградации хлорированных симметризинов / Д.П. Бажанов, К.И. Забенькова // Тез. межд. симп. «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология» (18–21 ноября 2001 г., г. Москва; 22–24 ноября 2001 г., г. Минск). – Минск, 2001. – С. 11–13.
5. De Souza, M.L. The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP / M.L. de Souza, L.P. Wackett, M.J. Sadowsky // Appl. Environm. Microbiol. – 1998. – V. 64. – P. 2323–2326.
6. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved / M.L. de Souza [et al.] // J. Bacteriol. – 1998. – V. 180. – P. 1951–1954.
7. Бажанов, Д.П. Плазмиды ризосферной бактерии В601, утилизирующей симазин / Д.П. Бажанов, К.И. Забенькова // Генетика и селекция в XXI веке. Мат. VIII съезда генетиков и селекционеров Республики Беларусь. Минск, 23–25 июля 2002 г. – С. 239.
8. Бажанов, Д.П., Мобилизация генов деградации симазина плазмидой pSa / Д.П. Бажанов, К.К. Яцевич // Цитология и генетика. – 2007. – № 1. – С.16–22.
9. Яцевич, К.К. Перенос способности утилизировать симазин в грамотрицательные бактерии при конъюгации. / К.К. Яцевич, Д.П. Бажанов // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. Мат. межд. конф. (26–28 мая 2004 г., Минск). – Минск, 2004. – С.176–177.
10. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). / L.M. Cruz [et al.] // Appl. Environm. Microbiol. – 2001. – V. 67. – P. 2375–2379.
11. 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.
12. Плазмиды. Методы / ред. К. Харди. – М.: Мир, 1990. – С. 82–83.
13. Characterization of type IV pilus genes in plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 / A. de Groot [et al.] // J. Bacteriol. – 1994. – V. 176. – P. 642–650.

Дата поступления статьи 15 ноября 2012 г.

Л.А. Кундас¹, К.В. Жур¹, Н.И. Бышне¹, Т.Н. Прохорова², Е.А. Лосицкий², П.Н. Малашевич², И.Б. Моссэ¹

АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ, У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ АКАДЕМИЧЕСКОЙ ГРЕБЛИ

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

²ГУ «Республиканский центр спортивной медицины» МСиТ
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, ул. Свердлова, 9

Введение

Академическая гребля представляет собой циклический вид спорта, требующий от спортсмена не только развития дыхательной системы и системы кровообращения, но и совершенствования точной координации в работе почти всех мышечных групп, а также развития скоростно-силовых возможностей.

Академическая гребля относится к тем видам спорта, которые повышают авторитет нашей страны на международной арене. Тем не менее, усиливающаяся конкуренция требует постоянного роста результатов. В современных условиях спорта высших достижений особую значимость приобретает выявление наиболее одаренных и перспективных спортсменов.

Исследования в области спортивной генетики убедительно показывают, что особое внимание следует уделять генетически обусловленным качествам и способностям спортсмена. К их числу следует отнести быстроту и силу, антропометрические показатели, способность к максимальному потреблению кислорода, экономичность функционирования вегетатив-

ных систем организма, психические особенности личности, продолжительность и качество восстановительных процессов после выполнения значительных тренировочных нагрузок.

Для проведения исследования нами были отобраны функционально значимые полиморфизмы 7 генов, белковые продукты которых оказывают значительное влияние на адаптацию спортсменов к интенсивным нагрузкам путем регуляции взаимосвязанных процессов в организме (обмен жиров и углеводов [1], обмен инсулина [2], увеличение скелетных мышц и миокарда, ангиогенез, термогенез и др.) [3, 4, 5].

Цель данной работы – установление частот полиморфных вариантов генов *ACE (I/D)*, *VEGF (G634C)*, *MB (A79G)*, *PPARG (Pro12Ala)*, *BDKRB2 (I/D)*, *HIF1A (C1772T)*, *UCP2 (Ala55Val)* в генотипах элитных спортсменов для выявления наиболее информативных маркеров, определяющих выраженность и стойкость адаптационных реакций к интенсивным физическим нагрузкам.

Материалы и методы

Проведено генетическое тестирование 24 высококвалифицированных спортсменов (мастера спорта (n = 6), заслуженные мастера спорта (n = 3), мастера спорта международного класса (n = 15)) Национальной команды Беларуси по академической гребле и 150 человек контрольной группы, профессионально не занимающихся спортом.

В качестве биологического материала использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови с помощью набора реагентов для выделения ДНК (Синтол, Россия). Концентрацию образца измеряли с помощью мини-

флюориметра *Qubit (Invitrogen, США)*. Генотипирование по полиморфизму *C1772T HIF1A*, *G634C VEGF*, *Ala55Val UCP2* осуществляли методом количественной ПЦР с использованием праймеров и TaqMan-зондов собственного дизайна и набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени (Синтол, Россия). Детекция флюоресценции, а также первичная обработка результатов осуществлялись программным обеспечением прибора *CFX96 (BIO-RAD, США)* в автоматическом режиме.

Для выявления однонуклеотидных замен генов *MB (A79G)*, *PPARG (Pro12Ala)*, *ACE (I/D)* и девяти-

тинуклеотидной делеции/инсерции гена *BDKRB2* проводился анализ длин амплификационных продуктов электрофоретическим разделением в 8% полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

Распределение генотипов и аллелей гена *HIF1A*

Транскрипционный фактор *HIF1a* играет ключевую роль в долгосрочной адаптации организма к нагрузке. Наличие полиморфизмов в последовательности ДНК гена, кодирующего *HIF1a*, может влиять на структуру мРНК фактора, его функциональное состояние и стабильность. По данным литературы, одним из таких полиморфизмов является однонуклеотидная замена цитозина на тимин, в результате которой происходит замещение аминокислоты пролин в 582 кодоне на серин (*C1772T*). Носительство *HIF1A 1772T* аллеля ассоциируется с повышенной экспрессией генов гликолиза, в результате чего происходит сдвиг в сторону анаэробного обеспечения мышечной деятельности, что является благоприятным для развития и проявления скоростно-силовых качеств [1].

При анализе распределения генотипов и аллелей полиморфизма *C1772T* гена *HIF1A* в группе спортсменов, занимающихся академической греблей, установлена более высокая частота аллеля *1772T* по сравнению с контрольной выборкой (12,5% против 4,4%; $p < 0,05$). Носителей редкого аллеля *1772T* в гомозиготном состоянии обнаружено не было (см. таблицу).

Распределение генотипов и аллелей гена *PPARG*

Полиморфизм *Pro12Ala* гена *PPARG* представляет собой замену нуклеотида *C* на *G* в 34 положении экзона В, что приводит к замещению в 12 кодоне пролина на аланин. Пониженная активность гена, ассоциируемая с носительством *Ala* аллеля, приводит к повышению чувствительности мышечной и жировой тканей к инсулину, (оказывающему анаболическое действие на скелетные мышцы) и увеличению утилизации глюкозы [2, 3]. Обнаружен гиперτροφический эффект *Ala*-аллеля гена *PPARG* в отношении мышечных волокон [4]. На основа-

Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрического критерия χ^2 (хи-квадрат) с использованием пакета *Microsoft Office Excel*. Для оценки значимости вклада каждого генотипа и аллеля вычислялся статистический показатель отношения шансов (*OR*, *odds ratio*).

нии этих данных *Ala* аллель можно рассматривать как маркер, ассоциированный с развитием и проявлением скоростно-силовых качеств [5]. При анализе распределения частот аллельных вариантов полиморфизма *Pro12Ala* гена *PPARG* в генотипах гребцов-академистов установлена более высокая частота генотипа *Ala/Ala* по сравнению с контрольной выборкой (12,5% против 2,2%; $p < 0,05$).

Распределение генотипов и аллелей гена *UCP2*

Ген *UCP2*, кодирующий митохондриальный разобщающий белок 2, участвует в термогенезе, регулирует обмен жиров, затраты энергии, а также влияет на секрецию инсулина и нейропротекцию.

Полиморфизм *Ala55Val* гена *UCP2* является наиболее изученным и ассоциируется с высокой метаболической эффективностью мышечной деятельности и физической активностью, а также с пониженным расходом энергии в покое, низкой утилизацией жирных кислот. Установлено, что экспрессия гена *UCP2* увеличивается в скелетных мышцах человека в ответ на тренировку аэробной направленности [6].

При анализе распределения аллельных вариантов полиморфизма *Ala55Val UCP2* отмечалась отчетливая тенденция к преобладанию генотипа *Val/Val* ($OR = 2,20$) в группе спортсменов, по сравнению с контролем (33,3% против 18,5%).

Распределение генотипов и аллелей гена *VEGF*

По данным литературы, *C* аллель гена *VEGF* ассоциирован с увеличением максимального потребления кислорода в результате аэробных тренировок. Установлено, что в культуре миобластов человека *VEGF C* аллель экспрессируется в большей степени, чем *G* аллель, что предполагает более выраженный адаптационный рост эндотелиев сосудов у носителей аллеля *C* в ответ на физические нагрузки аэробного характера [7].

Распределение частот аллельных вариантов генов, ответственных за устойчивость к физическим нагрузкам, в группе гребцов-академистов и в контрольной выборке

Гены	Варианты	Гребцы, %	Контрольная выборка, %	OR	95% CI	χ^2	P	
MB	Генотипы	GG	25,0	23,0	1,12	0,40–3,10	6,51	0,04
		GA	58,3	73,5	0,51	0,20–1,26		
		AA	16,7	3,5	5,45	1,26–23,60		
	Аллели	G	54,2	59,7	0,80	0,43–1,49	0,51	0,48
		A	45,8	40,3	1,26	0,67–2,35		
PPARG	Генотипы	Ala/Ala	12,5	2,2	6,38	1,21–33,73	6,21	0,04
		Pro/Ala	16,7	22,6	0,68	0,22–2,15		
		Pro/Pro	70,8	75,2	0,80	0,31–2,10		
	Аллели	Ala	20,8	13,5	1,69	0,77–3,67	1,76	0,18
		Pro	79,2	86,5	0,59	0,27–1,29		
HIF1A	Генотипы	CC	75,0	91,3	0,29	0,10–0,85	5,60	0,06
		CT	25,0	8,7	3,49	1,18–10,32		
		TT	0,0	0,0	0,00	–		
	Аллели	C	87,5	95,6	0,32	0,12–0,89	5,28	0,02
		T	12,5	4,4	3,13	1,13–8,69		
UCP2	Генотипы	Val/Val	33,3	18,5	2,20	0,83–5,85	3,34	0,19
		Val/Ala	41,7	60,2	0,47	0,19–1,16		
		Ala/Ala	25,0	21,3	1,23	0,44–3,46		
	Аллели	Val	54,2	48,6	1,25	0,67–2,34	0,48	0,49
		Ala	45,8	51,4	0,80	0,43–1,50		
BDKRB2	Генотипы	I/I	16,7	30,6	0,45	0,14–1,49	5,85	0,05
		I/D	50,0	56,9	0,76	0,30–1,91		
		D/D	33,3	12,5	3,50	1,17–10,51		
	Аллели	I	41,7	59,0	0,50	0,26–0,96	4,38	0,04
		D	58,3	41,0	2,02	1,04–3,91		
VEGF	Генотипы	GG	66,7	55,9	1,58	0,64–3,89	2,93	0,23
		GC	25,0	40,6	0,49	0,18–1,29		
		CC	8,3	3,5	2,48	0,47–13,08		
	Аллели	G	79,2	76,2	1,19	0,57–2,49	0,21	0,65
		C	20,8	23,8	0,84	0,40–1,76		
ACE	Генотипы	II	25,0	20,0	1,33	0,47–3,77	0,34	0,84
		ID	45,8	46,7	0,97	0,40–2,35		
		DD	29,2	33,3	0,82	0,31–2,17		
	Аллели	I	47,9	43,3	1,20	0,64–2,26	0,33	0,56
		D	52,1	56,7	0,83	0,44–1,56		

В группе исследуемых спортсменов отмечалась отчетливая тенденция к преобладанию генотипа *C/C* гена *VEGF* ($OR = 2,48$) по сравнению с контролем (8,3% против 3,5%), однако указанные различия не являлись статистически значимыми (см. таблицу).

Распределение генотипов и аллелей гена *BDKRB2*

Брадикинин – это биологически активное вещество, сосудорасширяющий фактор, который улучшает микроциркуляцию крови и повышает ударный объем желудочков сердца, опосредуя свое действие через соответствующий рецептор. Наличие девятинуклеотидной делеции/инсерции в гене *BDKRB2*, кодирующем данный рецептор, может оказывать значительное влияние на его функциональное состояние.

В работах различных авторов выявлена ассоциация аллеля *D* гена *BDKRB2* с высоким уровнем экспрессии мРНК рецептора, увеличивающего активность брадикинина, а также с более активным аэробным энергообеспечением у спортсменов видов спорта, преимущественно направленных на развитие кардиореспираторной функции [8, 9].

Частота генотипа *D/D* гена *BDKRB2* в группе спортсменов, занимающихся академической греблей, значимо отличалась от контрольной выборки (33,3% против 12,5%; $p = 0,05$).

Заключение

В результате проведенного анализа полиморфных вариантов генов, определяющих эффективность энергообеспечения и функционирование сердечнососудистой системы, показана существенно более высокая частота генотипов *A/A MB* ($OR = 5,45$; $p < 0,05$), *Ala/Ala PPARG* ($OR = 6,38$; $p < 0,05$), а также аллеля *T* гена *HIF1A* ($OR = 3,13$; $p < 0,05$) и аллеля *D* гена *BDKRB2* ($OR = 2,02$; $p < 0,05$) в группе спортсменов по сравнению с контрольной группой. Кроме того, отмечалась отчетливая тенденция к преобладанию генотипов *C/C* гена *VEGF* ($OR = 2,48$) и *Val/Val* ($OR = 2,20$) гена *UCP2* в группе спортсменов, однако указанная динамика не являлась статистически значимой. В то же время различий в частотах аллельных вариантов гена *ACE* в генотипах исследованных групп обнаружено не было.

Высокая частота генотипа *Ala/Ala PPARG*, ассоциированного с гипертрофическим ро-

Распределение генотипов и аллелей гена *MB*

Миоглобин – аналог гемоглобина эритроцитов крови, железосодержащий белок мышечных клеток, отвечающий за транспорт кислорода в скелетных мышцах и в мышце сердца [10]. В гене *MB*, кодирующем белок миоглобин, нами протестирован полиморфизм *A79G*, однонуклеотидная замена, которая предположительно может влиять на сродство миоглобина к кислороду и, следовательно, влиять на адаптацию спортсмена к физическим нагрузкам.

По результатам исследования было выявлено статистически значимое преобладание генотипа *A/A* в группе спортсменов по сравнению с контрольной группой (16,7% против 3,5%; $p < 0,05$).

Распределение генотипов и аллелей гена *ACE*

Ген *ACE*, кодирующий ангиотензинконвертирующий фермент (АКФ), играет ключевую роль в ренин-ангиотензиновой и калликреинкининовой системах – важнейших гуморальных регуляторов артериального давления. Под действием АКФ происходит образование ангиотензина II – наиболее активного сосудосуживающего вещества и деградация брадикинина – важного сосудорасширяющего фактора [11].

стом мышечных волокон, в группе гребцов-академистов свидетельствует о том, что кроме общей выносливости, для гребцов имеет большее значение максимальная мышечная сила. Преобладание генотипов *A/A* гена *MB*, *C/C* гена *VEGF*, *Val/Val* гена *UCP2*, а также аллеля *T* гена *HIF1A* и аллеля *D* гена *BDKRB2* в группе гребцов подтверждает литературные данные о важности скоростно-силовых способностей и силовой выносливости для достижения успеха в данном виде спорта [13]. Наличие перечисленных генотипов увеличивает сократительные, энергетические и окислительные способности мышц при выполнении длительной нагрузки и способствует увеличению максимальной скорости путем повышения мощности и емкости анаэробного алактатного энергообразования.

Полученные нами данные позволяют включить исследуемые полиморфизмы генов *MB*, *PPARG*,

HIF1A, *BDKRB2* в диагностический комплекс для отбора перспективных гребцов-академистов. В то же время для оценки вклада полиморфных вариантов генов *ACE*, *VEGF* и *UCP2* требуется проведение дальнейших исследований.

Идентификация генетических маркеров, обеспечивающих адаптацию к физическим

нагрузкам, позволяет не только прогнозировать развитие физических качеств человека, что имеет большое значение для отбора начинающих спортсменов, но и повысить эффективность профессиональной подготовки с учетом индивидуальных генотипических возможностей.

Список использованных источников

1. McPhee, J.S., Perez-Schindler, J., De-gens, H., Tomlinson, D., Hennis, P., Baar, K., Williams, A.G. HIF1A P582S gene association with endurance training responses in young women // *Eur J Appl Physiol*. – 2011. – № 111 (9). – С. 2339–2347.
2. Deeb, S.S. Pro12Ala substitution in PPAR gamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity / S.S. Deeb [et al.] // *Nat Genet*. – 1998. – № 20 (3). – С. 284–287.
3. Masud, S., Ye, S. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. / S. Masud, S. Ye // *J med genet*. – 2003. – № 40. – С. 773–780.
4. Рогозкин, В.А. Полиморфизм гена PPAR γ и двигательная деятельность человека. / В.А. Рогозкин [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2008. – № 11. – С. 567–569.
5. Ахметов, И.И. Ассоциация полиморфизмов генов-регуляторов с аэробной и анаэробной работоспособностью спортсменов / И.И. Ахметов [и др.] // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. – 2007. – Т. 93. – С. 837–843.
6. Ахметов, И.И. Молекулярная генетика спорта / И.И. Ахметов. – М.: Советский спорт, 2009. – С. 126–128, 144–146.
7. Prior, S.J. DNA sequence variation in the promoter region of the VEGF gene impacts VEGF gene expression and maximal oxygen consumption. / S.J. Prior [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2006. – 290 p.
8. Ma, J.X. Structure and chromosomal localization of the gene (*BDKRB2*) encoding human bradykinin B2 receptor / J.X. Ma [et al.] // *Genomics*. – 1994. – 23. – P. 362–369.
9. Синелев, В.А. Связь полиморфизма генов *BDKRB2* и *NOS3* с физической работоспособностью человека / В.А. Синелев [и др.] // *Научно-практические проблемы спорта высших достижений: материалы Международной конференции г. Минск, 4–5 декабря 2008 г. / НИИ физической культуры и спорта Республики Беларусь; под ред. А.В. Григорова – г. Минск, 2008. – С. 241–245.*
10. Wu, J., Hu, Y., Liu, G. SNP A79G in the second exon of the myoglobin gene in elite long distance runners // *Br J Sports Med*. – 2005. – V. 39. – P. 781–782.
11. Астратенкова, И.В. Анализ полиморфизма гена *ACE* у спортсменов / И.В. Астратенкова, А.И. Комкова // *Сб. науч. тр. / Федеральное агентство по физической культуре и спорту, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт физической культуры; под ред. В.А. Рогозкина. – СПб, 2006. – С. 33–44.*
12. Dias, R.G. Genetic polymorphisms determining of the physical performance in elite athletes / R.G. Dias [et al.] // *Rev Bras Med Esporte*. – 2007. – Vol. 13. – № 3 (Mai/Jun). – P. 186–192.
13. Иссурин, В.Б., Давыдов, В.Ю. Сравнительный анализ телосложения представителей мировой элиты гребцов на байдарках и каноэ // *Теория и практика физической культуры*. – 1994. – № 10. – С. 16–19.

Дата поступления статьи 21 декабря 2012 г.

Н.В. Савина¹, Т.Д. Кужир¹, А.И. Ролевич², С.Л. Поляков², С.А. Красный², Р.И. Гончарова¹

ОСОБЕННОСТИ ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ГЕНОМА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27
²ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»
Беларусь, 223040, Минский район, п. Лесной-2

Введение

Известно, что канцерогенез ассоциирован с геномной нестабильностью соматических клеток. Так, на больших когортах населения европейских стран показано, что увеличение частоты aberrаций хромосом и микроядер в лимфоцитах периферической крови указывает на повышенный риск возникновения рака [1, 2]. Кроме того, на примере длительного мониторинга цитогенетических нарушений в опухолевой ткани при раке мочевого пузыря показано, что повышенная частота митотической рекомбинации наблюдается уже на самых ранних стадиях развития онкопатологии [3]. И, наконец, при изучении клеточного ответа на повреждение ДНК при раке различной локализации установлено, что сигнальный путь ATM-Chk2-p53 активизируется на пресимптоматических стадиях образования злокачественной опухоли [4], что в свою очередь свидетельствует о накоплении повреждений ДНК в клетках. Поэтому оценка уровня повреждений ДНК может способствовать выявлению первичных признаков развивающейся геномной нестабильности и малигнизации клеток.

Нами предложена технология диагностики геномной нестабильности в лимфо-

цитах человека на основе применения метода ДНК-комет, которая апробирована на образцах периферической крови пациентов с предполагаемым диагнозом синдромов хромосомной нестабильности и микроделеций [5, 6], а также работников автомобильной промышленности [7, 8]. Эта технология позволяет выявлять признаки геномной нестабильности не только как общий феномен, присущий целой группе людей (например, в связи со специфическим заболеванием), но и у отдельных лиц, что обусловлено индивидуальными особенностями организма. На основании анализа данных, полученных на выборке из 172 здоровых представителей населения Беларуси, определены референтные интервалы, отражающие норму для каждого изучаемого параметра (уровня эндогенных/фоновых повреждений ДНК, чувствительности генома лимфоцитов к дополнительному мутагенному воздействию, кинетики и эффективности репарации ДНК) [8, 9]. В рамках данного исследования предложенная технология использована для оценки целостности и стабильности генома лимфоцитов при онкологической патологии.

Материалы и методы

Образцы периферической венозной крови получены от пациентов Отдела онкоурологической патологии РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова после подписания ими информированного согласия. Забор биологического материала проводился в соответствии с международными требованиями, анализировали образцы только от больных с гистологически установленным раком мочевого пузыря (РМП). Объект исследования – изо-

лированные лимфоциты. Выделение клеток из гепаринизированной крови проводили по общепринятой методике. В качестве модельного мутагена, индуцирующего окислительный стресс, использовали пероксид водорода (H₂O₂) в концентрации 100 мкМ. Выживаемость лимфоцитов, определяемая методом прижизненной окраски клеток трипановым синим, составляла 96–98% и не снижалась под влиянием использованной концентрации прооксидантного агента.

Для выявления повреждений ДНК использовали метод ДНК-комет (щелочную версию). Более подробное описание методики и условий эксперимента *in vitro* дано в предыдущих работах [5–8]. Визуальный анализ препаратов, окрашенных бромистым этидием, выполняли с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX-50. Уровни повреждений ДНК выражали в условных единицах (arbitrary units, a.u.). Для исследования процесса репарации ДНК учитывали уровень повреждений ДНК на 0, 30, 60 и 180-й минуте после мутагенного воздействия. Эффективность репарации ДНК (ЭР) определяли как процент элиминированных за определенное время повреждений ДНК по отношению к первоначально индуцированному уровню. Скорость репарации ДНК сравнивалась по коэффициентам линейной регрессии β , указывающим на угол наклона регрессионной прямой [6, 7].

Результаты и обсуждение

Характеристика групп обследования. Группа пациентов с гистологически установленным диагнозом РМП включала 40 человек. Средний возраст обследованных $69,55 \pm 1,57$ лет; 85% составляли мужчины; 89% – курящие. Контрольная группа клинически здоровых доноров включала 35 человек в возрасте от 22 до 63 лет, не контактирующих по роду профессиональной деятельности или месту проживания с мутагенами окружающей среды, без вредных привычек и хронических заболеваний, не подвергавшихся в течение последних 6-ти месяцев рентгенологическому обследованию и какому-либо лечению. В группе пожилых людей насчитывалось 15 клинически здоровых человек в возрасте старше 60-ти лет, среди которых 73% составляли мужчины. Группа лиц с хроническими воспалительными заболеваниями также включала 15 человек: 4 – с хроническим пиелонефритом; 9 – с хроническим деструктивным бронхитом; 2 – с ревматическими болезнями и полиартритом; все – в состоянии длительной ремиссии. Средний возраст обследуемых в этой группе составлял $48,87 \pm 2,86$ лет, среди них – 53% мужчин.

Оценка целостности и стабильности генома лимфоцитов у больных РМП по сравнению

Среднегрупповые параметры (уровни эндогенных и экзогенных повреждений ДНК, эффективность репарации ДНК) сравнивали с аналогичными показателями в контрольной группе здорового населения с помощью двустороннего *t*-критерия Стьюдента или непараметрического *U*-критерия Манн-Уитни. Группу больных с РМП дополнительно сравнивали с группой пожилых людей (старше 60-ти лет) и группой пациентов, указавших в своих анкетах наличие хронических воспалительных заболеваний. Кроме того, индивидуальные показатели в группах обследования сопоставляли с определенными заранее референтными интервалами [8, 9] для выявления лиц, лимфоциты которых отличаются от «нормальных» клеток по своему ответу на повреждения ДНК. Доля таких индивидуумов в разных группах сравнивалась по критерию χ^2 . Статистический анализ результатов выполнен в соответствии с рекомендованными подходами для медико-биологических исследований [10, 11].

с группой здоровых доноров. Результаты этого сравнения, представленные на рис. 1, показывают, что средние уровни индуцированных повреждений ДНК существенно выше у больных относительно здоровых. Статистически значимые различия доказаны как с помощью двустороннего теста Стьюдента ($p = 0,00035, 0,045, 0,037$ и $0,026$ соответственно 0, 30, 60 и 180-й мин анализа), так и непараметрическим методом Манна-Уитни ($0,01 < p < 0,05$).

Небольшое превышение среднего уровня эндогенных повреждений ДНК над контрольным не подтверждено статистически, так же как анализ коэффициентов линейной регрессии β не выявил каких-либо нарушений репарационного процесса в лимфоцитах больных РМП по сравнению с контрольной группой здоровых доноров.

Результаты исследования показывают, что при РМП наблюдается аномальный ответ лимфоцитов на окислительный стресс *in vitro*, возможно, за счет нарушения антиоксидантной защиты. Наблюдаемый эффект совпадает с тем, что известно из литературы о нарушении редокс-гомеостаза при канцерогенезе [12]. Однако сходные нарушения происходят при старении и болезнях пожилого возраста [13, 14], а также при воспалительных процессах,

которые обязательно предшествуют и/или сопутствуют раку [15]. Известно, что стадия промоции рака тесно связана с генерацией активных форм кислорода и острой воспалительной реакцией, которая характеризуется повышенной экспрессией и освобождением провоспалительных цитокинов, включая TNF- α [16], простагландинов (гормоно-подобных эндогенных медиаторов воспаления) и провоспалительных энзимов, прежде всего, циклооксигеназы-2 (СОХ-2) [17]. Характерно, что этот энзим не образуется в норме, а индуцируется цитокинами, митогенами, ростовыми факторами и промото-

рами рака, являясь маркером патологического состояния. Эпидемиологические исследования показывают, что СОХ-2 экспрессирована в 71% случаев рака толстой кишки и 81% случаев рака молочной железы [18]. В наших собственных исследованиях обнаружено, что доля чувствительных индивидуумов, лимфоциты которых проявляют аномальный ответ на повреждения ДНК, существенно выше в группе пожилых лиц (старше 60 лет) по сравнению с когортой здоровых людей до 60-ти лет; такие индивидуумы также чаще встречаются среди лиц с хроническими воспалительными заболеваниями [7]).

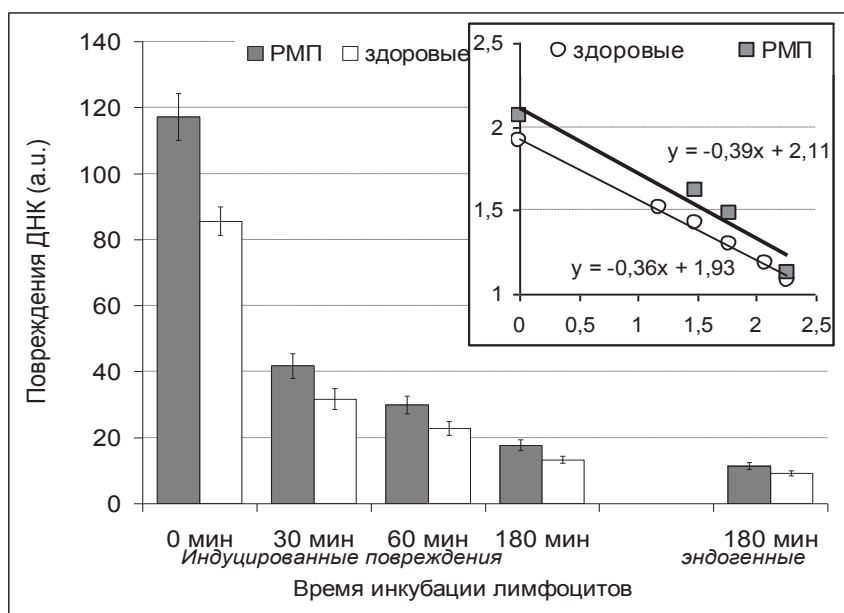


Рис. 1. Уровень повреждений ДНК (эндогенных и индуцированных H_2O_2) в лимфоцитах периферической крови больных РМП по сравнению с контролем

На вставке представлены данные в логарифмической системе координат. Сравнение коэффициентов линейной регрессии β ($-0,39$ и $-0,36$) показывает, что скорость репарации ДНК в лимфоцитах больных не изменена по сравнению с нормальным репарационным процессом у здоровых доноров

Оценка целостности и стабильности генома лимфоцитов у онкологических больных по сравнению с людьми пожилого возраста и лицами с хроническими воспалительными заболеваниями. Следует учитывать, что рак мочевого пузыря тесно ассоциирован с возрастом, полом, курением и профессиональными вредностями [19–21]. РМП встречается в 2,6 раза чаще у мужчин, чем у женщин, развивается преимущественно после 50 лет, среди внешних причин к основополагающим относятся курение и профессиональный контакт с ароматическими аминами и амидами, анили-

новыми красителями, сажей, хлорированными алифатическими углеводородами и многими альдегидами [21]. Однако если риск развития РМП под воздействием профессиональных вредностей в индустриально развитых странах составляет 5–10%, то вклад курения в эту патологию достигает 50% [20]. Поэтому второй задачей данного исследования было сравнение ответа лимфоцитов на повреждения ДНК у больных с РМП, пожилых людей без онкопатологии и лиц с хроническими воспалительными заболеваниями. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Ответ лимфоцитов на повреждения ДНК в группах больных РМП, пожилых людей и лиц с хроническими воспалительными заболеваниями

Анализируемые параметры	Группа РМП (n = 40)	Группа ≥ 60 лет (n = 15)	Группа лиц с хроническими воспалительными заболеваниями (n = 15)
Средний возраст	69,55 ± 1,57 ¹	62,8 ± 0,74	48,87 ± 2,86
Соотношение по полу жен/муж (% мужчин)	6/34 (85)	4/11 (73,33)	7/8 (53,33)
Курит/не курит (% курящих)	5/35 (89)	6/9 (60)	2/13 (13,33)
Эндогенные повреждения ДНК (а.у.), 180 мин	11,38 ± 1,09	9,93 ± 2,61	6,0 ± 1,32
H ₂ O ₂ -индуцированные повреждения ДНК (а.у.), 0 мин	117,13 ± 7,01 ²	89,33 ± 11,55	92,47 ± 7,97
Остаточный уровень индуцированных повреждений ДНК (а.у.), 180 мин	17,7 ± 1,59	18,2 ± 4,21	12,77 ± 3,03
Эффективность репарации ДНК (ЭР ₃₀) (ЭР ₁₈₀)	65,24 ± 2,08 84,25 ± 1,33	69,91 ± 3,82 81,27 ± 3,27	66,23 ± 4,03 84,72 ± 3,22

Примечание. ¹Существенные различия по возрасту ($p = 0,0004$ – для пожилых людей и $p < 0,0001$ – для пациентов с хроническими воспалениями). ²Существенные различия по начальному уровню индуцированных повреждений ДНК между группой РМП, лицами пожилого возраста ($p = 0,05$) и пациентами с хроническими воспалительными заболеваниями ($p = 0,027$). ЭР₃₀, ЭР₁₈₀ – эффективность репарации за 30 мин и 180 мин инкубации обработанных лимфоцитов при 37 °С.

Сравниваемые группы различались по возрасту, несмотря на то, что из контрольной выборки клинически здоровых лиц в группу пожилых людей отобраны индивидуумы не моложе 60 лет. В группах пожилых людей и больных РМП обследованы преимущественно мужчины и курящие. Группа лиц с хроническими воспалительными заболеваниями по этим параметрам отличалась как от больных РМП, так и пожилых людей. Альтернативными факторами, по которым, собственно, и проводилось сравнение, являлись: наличие/отсутствие РМП; наличие/отсутствие хронических воспалений. Отметим, что при наличии РМП увеличивалась чувствительность лимфоцитов к окислительному стрессу, при этом начальный уровень индуцированных повреждений ДНК в группе людей с онкологической патологией был существенно выше, чем в группах

пожилых людей и лиц с хроническими воспалительными заболеваниями. Эффективность репарации ДНК оставалась на одном уровне во всех группах и не отличалась от этого показателя у представителей здорового населения Беларуси.

Частота встречаемости индивидуумов с повышенной чувствительностью лимфоцитов к дополнительному мутагенному воздействию в группе пациентов с РМП по сравнению с группами лиц без онкологической патологии.

В качестве другого подхода проанализирована частота «чувствительных» индивидуумов с использованием ранее установленных референтных интервалов для всех изучаемых параметров [8, 9]. Напомним, что в качестве пограничных значений установлены 15 а.у. для уровня эндогенных повреждений ДНК, 110 а.у. для начального уровня

H_2O_2 -индуцированных повреждений, 25 а.у. для остаточного уровня H_2O_2 -индуцированных повреждений ДНК. Показатели, превышающие эти значения, свидетельствуют о повышенной чувствительности лимфоцитов к повреждениям ДНК у обследуемого человека.

Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что половина пациентов с РМП проявляет повышенную чувствительность лимфоцитов к окислительному стрессу *in vitro*, тогда как доля таких «чувствительных»

индивидуумов в контрольной группе составляет 14%, а в группах пожилых людей и пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями – 26%, то есть вдвое меньше, чем в группе онкологических больных. Несмотря на очевидные различия между частотами «чувствительных» индивидуумов в обследованных группах, их статистическая значимость пока доказана при сравнении группы пациентов с РМП с группой здоровых доноров.

Таблица 2

Доля индивидуумов с повышенной чувствительностью лимфоцитов к повреждениям ДНК в различных группах

Группа	Частота «чувствительных» индивидуумов (%) по отношению к:			
	эндогенным повреждениям ДНК	H_2O_2 -индуцированным повреждениям ДНК		Всего
		начальному уровню	остаточному уровню	
Пациенты с РМП (n = 40)	17,5	50 ¹	10	62,5 ²
Группа ≥ 60 лет (n = 15)	20,0	26,67	26,67	46,67
Группа лиц с хроническими воспалениями (n = 15)	6,67	26,67	6,67	46,67
Контроль (n = 35)	8,57	14,29	5,71	40,0

Примечание. ¹Существенные различия между всеми группами по критерию χ^2 ($p = 0,009$), а также между группой пациентов с РМП и контролем ($p = 0,001$). ²Существенные различия между группой пациентов с РМП и контролем ($p = 0,05$).

Таким образом, с помощью двух подходов установлено, что при РМП повышается чувствительность лимфоцитов к воздействию пероксида водорода. Сходные тенденции наблюдаются при старении и хронических воспалительных заболеваниях, но в соответствии с представленными данными, канцерогенез отличается более выраженной геномной нестабильностью. Учитывая данные А.А.G. van Tibrorn с соавторами [3], которые показали, что накопление генетических повреждений в виде увеличенной частоты мито-

тической рекомбинации происходит в течение всего процесса развития РМП, можно ожидать увеличения уровня геномной нестабильности при прогрессии опухоли. Однако следует осознавать, что опухолевая ткань находится в состоянии разбалансировки всех физиологических процессов и по своему ответу на повреждения ДНК должна существенно отличаться от лимфоцитов крови, которые отражают состояние генома всего организма. Поэтому эта проблема требует специального изучения.

Заключение

На примере пациентов с гистологически установленным раком мочевого пузыря (РМП) изучена взаимосвязь канцерогенеза с дестабилизацией генома лимфоцитов периферической крови. В работе использована технология, позволяющая с помощью метода ДНК-комет учитывать повышенные уровни эндогенных повреждений ДНК, повышенную чувствительность лимфоцитов к дополнительному мутагенному воздействию и пониженную репарационную способность клеток в качестве индикаторов развивающейся геномной нестабильности. Сравнение целостности и стабильности генома лимфоцитов в группах пациентов с РМП и здоровых доноров позволило установить аномальный ответ лимфоцитов на воздействие пероксида водорода *in vitro* при онкопатологии. Показано, что начальный уровень индуцированных

повреждений ДНК при РМП также существенно выше по отношению к группе пожилых людей и пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями. Обнаружено значительное повышение доли индивидуумов, лимфоциты которых более чувствительны к окислительному стрессу, среди пациентов с РМП по сравнению с контрольной группой здоровых лиц. Оба подхода (сравнение среднегрупповых показателей и доли индивидуумов с аномальным ответом лимфоцитов на индукцию повреждений ДНК пероксидом водорода) позволили выявить признаки дестабилизации генома в связи с нарушением редокс-гомеостаза клеток крови при наличии рака. Следовательно, повышенная чувствительность лимфоцитов к окислительному стрессу *in vitro* может служить ранним биомаркером канцерогенеза.

Список использованных источников

1. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries / S. Bonassi [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2008. – Vol. 29, No. 6. – P. 1178–1183.
2. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies / S. Bonassi [et al.] // *Mutagenesis*. – 2011. – Vol. 26, No. 1. – P. 93–100.
3. Molecular evolution of multiple recurrent cancers of the bladder / A.A.G van Tiborn [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2000. – Vol. 9, No. 20. – P. 2973–2980.
4. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis / J. Bartkova [et al.] // *Nature*. – 2005. – Vol. 434 (7035). – P. 864–870.
5. Chromosomal instability at the 7q11.23 region impacts on DNA damage response in lymphocytes from Williams-Beuren syndrome patients / N.V. Savina [et al.] // *Mutation Research*. – 2011. – Vol. 724. – P. 46–51.
6. Biomarkers for genome instability in some genetic disorders: a pilot study / N.V. Savina [et al.] // *Biomarkers*. – 2012 a. – Vol. 17 (3). – P. 201–208.
7. DNA-damage response associated with occupational exposure, age and chronic inflammation in workers in the automotive industry / N.V. Savina [et al.] // *Mutat Res.* – 2012 b. – Vol. 748. – P. 21–28.
8. Оценка стабильности генома лимфоцитов у людей, занятых в автомобильном производстве / Т.Д. Кужир [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2012. – Т. 56, № 4. – С. 72–76.
9. Савина, Н.В. Параметры нормального ответа лимфоцитов на повреждения ДНК: референтные интервалы / Н.В. Савина, Т.Д. Кужир // Молекулярная и прикладная генетика: Сб. науч. тр. – Минск, 2012. – Т. 13. – С. 74–81.
10. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. / М.: Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
11. Эпидемиология и статистика как инструменты доказательной медицины. Издание второе, исправленное и дополненное / Е.А. Корнышева [и др.]. – Тверь, 2009. – 80 с.
12. Klaunig, J.E. The role of oxidative stress in carcinogenesis / J.E. Klaunig, L.M. Kamendulis // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2004. – Vol. 44. – P. 239–267.
13. Oxidative stress and the aging brain: from theory to prevention / C. Gemma in: *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. (D.R. Riddle, ed.) // Boca Raton (FL): CRC Press, 2007. – Chapter 15.

14. Age-related changes in an antioxidant defense system in elderly patients with essential hypertension compared with healthy controls / J. Rybka [et al.] // *Redox. Rep.* – 2011. – Vol. 16. – P. 71–77.
15. Bartsch, H. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair / H. Bartsch, J. Nair // *Langenbecks Arch. Surg.* – 2006. – Vol. 391. – P. 499–510.
16. Discrete role of cytokines, TNF α , IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation / M. Suganuma [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 131–136.
17. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer / H. Sano [et al.] // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55. – P. 3785–3789.
18. Moran, E.M. Epidemiological and clinical aspects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and cancer risk / E.M. Moran // *Proceedings of ICMAA-VIII, Pisa, Italy, 4–8 October, 2003.* – P. 98.
19. Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes / S.M. Cohen [et al.] // *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* – 2000. – No. 205. – P. 105–115.
20. Janković, S. Risk factors for bladder cancer / S. Janković, V. Radosavljević // *Tumori.* – 2007. – Vol. 93. – P. 4–12.
21. Prevention of bladder cancer: a review / J.T. Leppert [et al.] // *Eur. Urol.* – 2006. – Vol. 49. – P. 226–234.

Дата поступления статьи 4 декабря 2012 г.

ТЕЛОМЕРНАЯ КОНЦЕПЦИЯ СТАРЕНИЯ И ОНКОГЕНЕЗА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ (обзорная статья)

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

Сокращение теломер как механизм клеточного старения

Открытие теломер связано с именами лауреатов Нобелевской премии генетиков Германа Меллера и Барбары Мак-Клинток. В исследованиях, выполненных в тридцатые годы XX столетия, они показали, что на концевых хромосомных участках находятся структуры, предотвращающие слияние хромосом [1, 2]. Название «теломеры» предложил Меллер.

В 1972 г. Джеймс Уотсон сформулировал «проблему концевой недорепликации ДНК» (end-replication problem), в соответствии с которой ДНК-полимераза не может полностью синтезировать 3'-конец линейной молекулы ДНК [3]. В этот же период Алексей Матвеевич Оловников (независимо от Уотсона) пошел в своих предположениях дальше и предсказал, что концевая недорепликация ведет к укорочению теломер (маргинотомии) в каждом раунде синтеза ДНК во время клеточного деления, и что этот процесс является причиной репликативного старения, то есть утраты клетками способности к делению, обнаруженной Леонардом Хайфликом [4, 5]. Предсказания Оловникова оказались удивительно точными. Для инициации синтеза ДНК-полимеразой в направлении 5'-3' требуется РНК-праймер. ДНК-полимераза синтезирует лидирующую цепь до самого конца хромосомы, но в отстающей цепи (lagging strand) ДНК-полимераза синтезирует фрагменты, называемые фрагментами Оказаки, причем каждый фрагмент требует наличия РНК-праймера. В отсутствие ДНК, которая служила бы матрицей для нового праймера, репликация концевого участка невозможна, и поэтому происходит его утрата при каждом раунде синтеза ДНК.

Еще до открытия теломеразы было известно, что укорочение теломер происходит при старении фибробластов человека [6], и сокращение теломер стали называть молекулярными

часами, отсчитывающими клеточные деления. Теломераза – это обратная транскриптаза, которая удлиняет теломеры [7]. Она состоит из теломеразной РНК (TR или TERC – telomerase RNA component) и белковой каталитической субъединицы – TERT (telomerase reverse transcriptase) [8, 9]. Каталитическую единицу теломеразы человека обозначают как hTERT. В соответствии с предсказаниями Оловникова теломераза активно работает в иммортализованных (нестареющих) клеточных линиях [10]. При трансгенном введении hTERT в нормальные (стареющие) фибробласты они иммортализовались, что проявлялось в отсутствии репликативного старения и окрашивания на бета-галактозидазу, которая является маркером клеточного старения [11]. Впрочем, работа теломеразы – не единственный механизм удлинения теломер, поскольку существуют иммортализованные клеточные линии с отсутствием теломеразной активности [12]. Появился термин «альтернативное удлинение теломер», механизм которого может быть основан на процессах рекомбинации [13]. У человека ДНК теломер представляют собой многократно повторяющуюся (от сотен до тысяч раз) гексануклеотидную последовательность TTAGGG [14].

Критически короткие теломеры вызывают остановку клеточного цикла на стадии G1/S. При этом дисфункция теломер активизирует каскад сигнальных путей, связанных с повреждением ДНК, включая активацию белка p53 [15]. p53, в свою очередь, активирует p21, блокирующий действие циклин-зависимых киназ (CDKs), предотвращающих фосфорилирование белка ретинобластомы pRb. Без фосфорилирования pRb не транскрибируются гены, работа которых важна для перехода G1/S, и клеточный цикл блокируется [15].

Следует отметить, что длина теломер – не единственная характеристика, от которой зависит способность клеток к делению. Об этом свидетельствует то, что в иммортализованных клетках теломеры короче, чем в контролях с остановленным ростом [16]. Кроме того, у дрожжей штаммы с отсутствием теломеразной активности стареют с более длинными теломерами, чем иммортализованные штаммы, позитивные по теломеразе [17]. С использованием электронной микроскопии было показано, что теломеры формируют дуплексы, называемые Т-петлями (t-loops), в состав которых входят связывающиеся с теломерными повторами белковые факторы TRF1 [18] и TRF2 [19]. По-видимому, Т-петли (теломерные кэпы), а не только длина теломер, важны для предотвращения теломерной дисфункции и клеточного старения.

Несмотря на очевидную связь старения с теломерами важно помнить, что имеются свидетельства в пользу того, что сокращение теломер является не единственным механизмом старения клеток: культуральный стресс активирует p16 и индуцирует старение клеток независимо от теломер [20]. Кроме того, представляют интерес данные о межвидовых различиях (например, при сравнении клеток человека и мыши) взаимосвязи репликативного старения и теломерной дисфункции [21, 22]

У человека соматические ткани большей частью (но не все) не имеют заметной теломеразной активности [23]. При этом особо интересно, что в ряде тканей человека наблю-

дается временная (транзиентная) активизация теломеразы, что резко контрастирует с ее конститутивной активацией в большей части раковых опухолей [23]. В этой связи, на наш взгляд, существует возможность, что даже в тех тканях, в которых не была зарегистрирована теломеразная активность (или синтез матричной РНК гена hTERT), при определенных условиях возможно транзиентное стимулирование теломеразы. Это определяет целесообразность поиска методов регуляции теломеразы в соматических клетках человека. При этом репрессия теломеразы для подавления роста опухолей должна быть сбалансирована с активизацией теломеразы для противодействия старению и возобновления способности тканей к восстановлению. В связи с этим интересно отметить, что стволовые клетки крови и кожи демонстрируют лишь слабую теломеразную активность, которая по крайней мере на порядок меньше, чем у раковых клеток *in vitro*; вместе с тем, некоторые митотически гиперактивные потомки этих стволовых клеток проявляют высокую теломеразную активность, позволяющую остановить или даже обратить вспять сокращение теломер [23].

Имеются данные о связи происходящего с возрастом укорочения теломер в некоторых тканях человека со смертностью. Так, в клетках крови найдена обратная корреляция между смертностью и длиной теломер после 60 лет [24]. Стрессовые условия жизни способствовали ускоренному укорочению теломер клеток крови [25].

Определение активности теломеразы в онкодиагностике

Выявление активности теломеразы в тканях является одним из способов выявления злокачественных новообразований. Метод TRAP (telomeric repeat amplification protocol) позволяет выявлять даже самую слабую теломеразную активность. Данный метод может быть основан на автордиографическом детектировании продуктов теломеразной активности. Однако высокая чувствительность этого метода может приводить к ложноположительным результатам. С целью увеличения диагностической ценности метода TRAP Kim и соавторы разработали модифицированный метод, обладающий меньшей чувствительностью и позволяющий выявлять теломеразную

активность, характерную для раковых клеток [26]. Кроме того, данный метод не требует специального оборудования для работы с радиоактивными метками, что делает его более доступным. Данная методика основана на PCR-амплификации продуктов теломеразной реакции, полученных при удлинении ферментом специфического праймера.

В работе [27] проведено определение длины теломер, уровня теломеразной активности, характера экспрессии белковой субъединицы hTERT и РНК-компонента hTR теломеразы у детей с острым лимфобластным лейкозом. Установлено, что уровень теломеразной активности значительно выше при острых лим-

фобластных лейкозах в первый острый период и рецидивах по сравнению с пациентами в ремиссии и здоровыми людьми. Отмеченная обратная корреляция может регулироваться как на уровне экспрессии каталитической субъединицы hTERT, так и на уровне альтернативного сплайсинга транскриптов этого гена. Выявлены различия в соотношении вари-

антов транскриптов мРНК hTERT у больных в первый острый период и в стадии ремиссии. Сделано заключение о том, что определение длины теломер, уровня теломеразной активности и экспрессии hTERT и вариантов его транскриптов может служить характеристикой опухолевого клона у детей с острым лимфобластным лейкозом [27].

Антираковые ингибиторы теломеразы

Идея использования ингибиторов теломеразы для лечения онкозаболеваний основана на подавлении пролиферации раковых клеток посредством сокращения теломер. При этом следует учитывать, что антителимеразные препараты по механизму действия должны отличаться от существующих лекарств тем, что они не уничтожают раковые клетки немедленно, и что заметные антипролиферативные эффекты ингибиторов теломеразы могут проявиться через недели или месяцы регулярного приема [28]. Это также свидетельствует о целесообразности их использования скорее для профилактики и терапии вторичных, а не первичных сильно развившихся опухолей, причем желательно их применение для адьювантной терапии совместно со средствами, действующими посредством иных механизмов [29].

Олигонуклеотиды, комплементарные к РНК-компоненту теломеразы, могут ингибировать ее активность [29]. Два антителимеразных олигонуклеотида одобрены, и еще несколько проходят клинические испытания [30]. Компания Geron Corporation разрабатывает

ингибирующие теломеразу олигомеры, содержащие фосфорамидный каркас [31]. Исследователи полагают, что терапевтические олигонуклеотиды не могут эффективно проникать в культивируемые клетки в отсутствие трансфецирующих агентов. Однако, фосфорамидные олигомеры являются сильными ингибиторами теломеразы без трансфекции [31]. 2'-метоксиэтиловые олигонуклеотиды также хорошо поглощались клетками [32]. Добавление липидной группы еще более улучшило эффективность тиофосфорамидных олигомеров [33]. Липид-содержащие олигонуклеотиды GRN163L уменьшали рост опухоли у животных [34]. GRN163L также находился в клинических испытаниях при ряде онкологических заболеваний у людей [35].

Дисульфид-содержащие (биоредуцируемые) катионные полимеры, в частности, дисульфид-содержащий полиэтиленмин, использовали для доставки малых интерферирующих РНК с целью подавления hTERT. При этом происходило значительное подавление роста разных раковых линий *in vitro* и опухолей *in vivo* [36].

Нарушения теломерного гомеостаза при атеросклерозе

Атеросклероз является лидирующей причиной смертности, даже опережая онкологические заболевания. Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о том, что этиология этой группы ассоциированных с возрастом заболеваний связана с нарушениями теломерного гомеостаза [37]. Длина теломер определяется не только числом клеточных репликаций, но и подвержена наследственным и средовым факторам риска. Так, у потомства родителей с коронарной болезнью теломеры короче, чем у здоровых людей [38]. Курение, ожирение, резистентность к инсулину и диабет 2 типа связаны с ускоренным укорочением теломер [39–41].

Вместе с тем, установлено, что активизация теломеразы может быть достигнута изменением образа жизни, включая здоровую диету, снятие стресса посредством медитации, регулярные высокоинтенсивные аэробные физические упражнения и некоторые фармакологическими препаратами (см. ниже).

Таким образом, длина теломер и активности теломеразы являются уникальными молекулярно-генетическими маркерами, позволяющими оценивать комбинированное влияние наследственных и средовых факторов в развитии коронарных заболеваний, а также при разработке средств их профилактики и терапии.

Средства сохранения и восстановления теломер

Сохранению длины теломер способствовали интенсивные и регулярные аэробные физические упражнения, выполняемые 5 дней в неделю по 45 минут ежедневно в течение 5 лет [42]. Молекулярные механизмы защитного влияния упражнений на сердце посредством активизации теломеразы были исследованы на экспериментальных животных. Показано, что упражнения способствуют выживанию клеток и повышают активность теломеразы и экспрессию белкового фактора TRF2, стабилизирующего структуру Т-петли на концах теломер. Повышение теломеразной активности было опосредовано инсулиноподобным фактором 2 (IGF2) и эндотелиальной синтазой оксида азота. Кроме того, при упражнениях снижались уровни маркеров останова роста и апоптоза, такие как p16, p53 и киназа клеточного цикла 2 [37].

Вещества, повышающие активность теломеразы, могут быть использованы для предотвращения утраты теломерной ДНК. Компоненты, экстрагируемые из растений *Astragalus* и *Ginkgo biloba*, а также ресвератрол активизируют теломеразу, причем действие ресвератрола опосредовано сигнальным путем PI3k/Akt. N-ацетилцистеин и альфа-токоферол также повышают активность теломеразы [43, 44]. У пациентов с коронарной болезнью при пятилетнем наблюдении обнаружена обратная зависимость между содержанием в крови жирных кислот омега-3 (получаемых при употреблении морепродуктов) и скоростью сокращения теломер [45]. Аспирин, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и, в частности, статиновая терапия благоприятно влияют на сосудистый эпителий посредством противодействия клеточному старению. Помимо антитромботических и противовоспалительных эффектов аспирин понижает образование диметиларгинина, который является эндогенным ингибитором синтазы оксида азота и посредством этого уменьшает окислительный стресс и замедляет старение клеток эндотелия [46]. Содержащие сульфгидрильные группы

ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента также замедляют эндотелиальное старение посредством стимуляции фосфорилирования протеин-киназой Akt, ведущей к повышению экспрессии синтазы оксида азота и активизации теломеразы [47]. Статины повышали миграционную способность клеток-предшественников эндотелия путем ап-регуляции связывающегося с теломерами белка TRF2 [48]. Интенсивная статиновая терапия в течение 12 месяцев предотвращала эрозию хромосом у пациентов с коронарной болезнью [49], а также положительно коррелировала с длиной теломер у больных инфарктом миокарда в возрасте до 64 лет [50].

Доступность количественной полимеразной цепной реакции, которая проще, дешевле и требует меньшего труда по сравнению со стандартным саузерн-блоттингом, определяет удобство ее использования для анализа длины теломер [51–52]. Оценка теломерной динамики может служить нескольким целям [37]. Во-первых, измерение длин теломер в первые годы жизни может выявлять индивидуумов с генетической предрасположенностью к некоторым заболеваниям для индивидуальной профилактики. Во-вторых, длина теломер является мерой кумуляции повреждений ДНК под воздействием средовых факторов риска в течение индивидуальной жизни и, по-видимому, позволяет оценивать вероятность наступления заболеваний. В-третьих, хотя развитие и прогрессирование некоторых болезней (например, атеросклероза) происходит в течение десятилетий, результат этого процесса становится клинически значимым только при полном проявлении заболеваний. Поскольку скорость сокращения теломер до начала болезни ускоряется, лонгитудинальные измерения длины теломер могут использоваться для определения риска. Наконец, количественное определение состояния теломер и теломеразной активности требуется для оценки эффективности новых методов профилактики и терапии заболеваний.

Неканонические функции теломеразы

Теломераза выполняет критическую роль в поддержании свойств стволовых клеток и в тканевом гомеостазе [53]. Представляет осо-

бый интерес то, что эта роль определяется не только восстановлением длины теломерных повторов посредством обратной транс-

крипции, но и еще слабо изученными неканоническими функциями [54]. Эти функции можно разделить на 2 группы [54]. К первой относятся функции, требующие наличия активной теломеразы, но не связанные с удлинением теломер (неканоническая функция 1 – NC I). Для осуществления NC II не требуются ни теломеразная активность, ни удлинение теломер, хотя требуется наличие белковой субъединицы фермента hTERT. Функции NC I связаны с корректной реакцией на повреждения ДНК и нечувствительностью к трансформирующему фактору роста beta, а также с индукцией неоплазий эпидермиса и молочной железы [54]. Интересно, что осуществление функций NC II, напротив, не приводит к развитию неоплазий. Функции NC II связаны с активацией сигнальных путей WNT и MYC (это показано, в частности, на кератиноцитах), а также с возрастанием резистентности к индукции апоптоза (клеточной гибели), запускаемого разнообразными стимулами. По-видимому, сверхэкспрессия как TERT, так и TERC обеспечивает NC I, но NC II не требуют ни TERC, ни целостности каталитического сайта TERT. Молекулярные механизмы NC I и NC II в основном неизвестны, но имеются данные об изменениях профилей транскрипции. Представляется важным изучение этих механизмов в связи с их значением для функционирования нормальных и малигнизированных клеток.

Эктопическая сверхэкспрессия hTERT приводила к уменьшению спонтанной дифференцировки и усилению стволовых клеточных свойств в линиях мезенхимальных стволовых клеток человека [55]. При этом понижался уровень метилирования ДНК, что было показано анализом профиля метилирования CpG-островков, причем деметилированные

CpG-островки были в высокой степени ассоциированы с генами развития и дифференцировки. Компонентный анализ показал, что профиль экспрессии генома в высокой степени сходен с таковым у эмбриональных стволовых клеток. Следовательно, важнейшей функцией теломеразы, наряду с поддержанием длины теломер, является глобальная перестройка эпигенетического статуса клеточного генома. Из этих данных следует важный вывод о том, что изменение экспрессии единственного гена (в данном случае гена hTERT) может запускать процесс глобального эпигенетического репрограммирования в сторону плюрипотентности и, возможно, более молодого состояния клеток.

С точки зрения задач разработки технологий сингенной клеточной трансплантации для регенеративной медицины представляется важным направление исследований, связанное с модификацией функционирования теломеразы в культурах клеток из тканей взрослого организма. В частности, регулируемая экспрессия трансгенной TERT в клетках из волосяных фолликулов вызывала быстрый переход из телогена (стадия покоя цикла волосяного фолликула) в анаген (активная фаза), тем самым способствуя интенсивному росту волос [56]. Сверхэкспрессия TERT способствует этому развитийному переходу путем индуцирования пролиферации покоящихся мультипотентных стволовых клеток в районе “bulge”. Эта новая функция TERT не требует РНК-ового компонента теломеразы и, следовательно, работает посредством механизма, не зависящего от синтеза теломерных повторов. Эти данные также указывают на то, что наряду с известной ролью в удлинении теломер TERT может способствовать пролиферации покоящихся стволовых клеток посредством неканонического сигнального пути.

Заключение

Теломеры – концевые участки хромосом, формирующие дуплексы – Т-петли, препятствующие слиянию с другими хромосомами. В состав теломер входят многократно повторяющиеся повторы олигонуклеотида (у человека – гексануклеотида TTAGGG) и белковые факторы TRF1 и TRF2. Укорочение теломерной ДНК (маргинотомия) в результате концевой недорепликации и

накопления повреждений является одним из механизмов клеточного старения и связанных с возрастом заболеваний. Процессы сокращения теломер противодействуют фермент теломераза и мало изученные альтернативные механизмы восстановления длины теломерной ДНК. Теломераза состоит из каталитической белковой субъединицы (TERT) и РНК-матрицы, с помощью которой

TERT достраивает теломерные повторы и удлиняет теломеры. Теломераза выполняет также некоторые неканонические функции, включая глобальное эпигенетическое репрограммирование в сторону плюрипотентности и, возможно, более молодого состояния клеток. Конститутивная активизация теломеразы характерна для большей части раковых

опухолей. Поэтому ингибирование теломеразы используется в онкотерапии. В то же время регулируемое временное повышение теломеразной активности перспективно для замедления старения и омоложения клеток, что может найти применение в лечении связанных с возрастом заболеваний и способствовать продлению жизни людей.

Список использованных источников

1. Muller, H. The remaking of chromosomes // *Collecting Net.* – 1938. – Vol. 13, № 8. – P. 182–198.
2. McClintock, B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays* // *Genetics.* – 1941. – Vol. 26. – P. 234–282.
3. Watson, J. Origin of concatemeric T7 DNA // *Nat. New Biol.* – 1972. – Vol. 239, № 94. – P. 197–201.
4. Olovnikov, A. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides // *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* – 1971. – Vol. 201, № 6. – P. 1496–1499.
5. Olovnikov, A. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* – 1973. – Vol. 41, № 1. – P. 181–190.
6. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts / C. Harley [et al.] // *Nature.* – 1990. – Vol. 345, № 6274. – P. 458–460.
7. Greider, C. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts / C. Greider, E.H. Blackburn // *Cell.* – 1985. – Vol. 43, № 2. – P. 405–413.
8. The RNA component of human telomerase / J. Feng [et al.] // *Science.* – 1995. – Vol. 269, № 5228. – P. 1236–1241.
9. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human / T. Nakamura [et al.] // *Science.* – 1997. – Vol. 277, № 5328. – P. 955–959.
10. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity / C. Counter [et al.] // *Embo J.* – 1992. – Vol. 11, № 5. – P. 1921–1929.
11. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells / A. Bodnar [et al.] // *Science.* – 1998. – Vol. 279, № 5349. – P. 349–352.
12. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity / T. Bryan [et al.] // *Embo J.* – 1995. – Vol. 14, № 17. – P. 4240–4248.
13. Telomere maintenance by recombination in human cells / M. Dunham [et al.] // *Nat. Genet.* – 2000. – P. 26, № 4. – P. 447–450.
14. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes / R. Moyzis [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – Vol. 85. – P. 6622–6626.
15. De Magalhaes, J. From cells to ageing: a review of models and mechanisms of cellular senescence and their impact on human ageing // *Exp. Cell Res.* – 2004. – Vol. 300, № 1. – P. 1–10.
16. Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process / C. Ducray [et al.] // *Oncogene* 1999. – Vol. 18, № 29. – P. 4211–4223.
17. Specific telomerase RNA residues distant from the template are essential for telomerase function / J. Roy [et al.] // *Genes Dev.* – 1998. – Vol. 12, № 20. – P. 3286–3300.
18. Van Steensel, B. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1 / B. Van Steensel, T. de Lange // *Nature.* – 1997. – Vol. 385, № 6618. – P. 740–743.
19. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2 / A. Smogorzewska [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 20, № 5. – P. 1659–1668.
20. A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status / J.G. Rheinwald [et al.] // *Mol Cell Biol.* – № 22 (14). – 2002. – P. 5157–5172.
21. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells / N. Hamad [et al.] // *Genes Dev.* – 2002. – Vol. 16, № 16. – P. 2045–2057.

22. Expression profiles of p53-, p16(INK4a)-, and telomere-regulating genes in replicative senescent primary human, mouse, and chicken fibroblast cells / H. Kim [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2002. – Vol. 272, № 2. – P. 199–208.
23. Collins, K. Telomerase in the human organism / K. Collins, J. Mitchell // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21, № 4. – P. 564–579.
24. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older / R. Cawthon [et al.] // *Lancet.* – 2003. – Vol. 361, № 9355. – P. 393–395.
25. Accelerated telomere shortening in response to life stress / E. Epel [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, № 49. – P. 17 312–17 315.
26. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer / N. Kim [et al.] // *Science.* – 1994 – Vol. 266. – P. 2011–2015.
27. Telomerase activity and telomere length in malignant cells of children with acute lymphoblastic leukemia / A. Kustanovich [et al.] // *Experimental Oncology* 2003. – Vol. 25. – P. 69–73.
28. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts / C. Harley [et al.] // *Nature.* – 1990. – Vol. 345. – P. 458–460.
29. Telomerase inhibitors for the treatment of cancer: the current perspective / P. Perry [et al.] // *Expert Opin. Investig. Drugs.* – 2001 – Vol. 10, № 12. – P. 2141–2156.
30. Corey, D. Chemical Modification: The Key to the Clinical Application of RNA Interference? // *J. Clin. Invest.* 2007. – Vol. 117. – P. 3615–3622.
31. Oligonucleotide N3'-P5' phosphoramidates as efficient telomerase inhibitors / B-S. Herbert [et al.] // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21. – P. 638–642.
32. Effect of Telomerase Inhibition and Combination Treatments on Cancer Cell Proliferation / Z. Chen [et al.] // *Cancer Research.* – 2003. – Vol. 63. – P. 5917–5925.
33. Lipid modification of GRN163, an N3'-P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition / B-S. Herbert [et al.] // *Oncogene* – 2005. – Vol. 24. – P. 5262–5268.
34. In vivo inhibition of lung cancer by GRN153L: A novel human telomerase inhibitor / Z. Dikmen [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 7866–7873.
35. Harley, C. Telomerase and cancer therapeutics // *Nature Reviews Cancer.* – 2008. – Vol. 8. – P. 167–179.
36. Xia, W. Bioreducible polymer-delivered siRNA targeting human telomerase reverse transcriptase for human cancer gene therapy / W. Xia, C. Lin // *Ther. Deliv.* – 2012. – Vol. 3, № 4. – P. 439–442.
37. Telomeres and atherosclerosis / S. Khan [et al.] // *Cardiovasc. J. Afr.* – 2012. – Vol. 23, № 10. – P. 563–571.
38. Telomere length is shorter in healthy offspring of subjects with coronary artery disease: support for the telomere hypothesis / S. Brouillette [et al.] // *Heart.* – 2008. – Vol. 94. – P. 422–425.
39. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women / A. Valdes [et al.] // *Lancet.* – 2005. – Vol. 366. – P. 662–664.
40. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study / S. Demissie [et al.] // *Aging Cell.* – 2006. – Vol. 5. – P. 325–330.
41. Telomere shortening occurs in Asian Indian Type 2 diabetic patients / A. Adaikalakoteswari [et al.] // *Diabet. Med.* – 2005. – Vol. 22. – P. 1151–1156.
42. Leukocyte telomere length is preserved with aging in endurance exercise-trained adults and related to maximal aerobic capacity / T. La Rocca [et al.] // *Mechan. Ageing Develop.* – 2010. – Vol. 131. – P. 165–167.
43. Tarkanyi, I. Pharmacological intervention strategies for affecting telomerase activity: Future prospects to treat cancer and degenerative disease / I. Tarkanyi, J. Aradi // *Biochimie.* – 2008. – Vol. 90. – P. 156–172.
44. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms / L. Xia [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 155. – P. 387–394.
45. Association of marine omega-3 fatty acid levels with telomeric aging in patients with coronary heart disease / R. Farzaneh-Far [et al.] // *J. Am. Med. Assoc.* – 2010. – Vol. 303, № 3. – P. 250–257.
46. Aspirin reduces endothelial cell senescence / S. Bode-Boger [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 334. – P. 1226–1232.

47. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor promotes endothelial cell survival through nitric-oxide synthase, fibroblast growth factor-2, and telomerase cross-talk / S. Donnini [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – Vol. 332, № 3. – P. 776–784.
48. Statins enhance migratory capacity by up-regulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells / I. Spyridopoulos [et al.] // *Circulation* – 2004. – Vol. 110. – P. 3136–3142.
49. Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease / M. Satoh [et al.] // *Clin. Sci.* – 2009. – Vol. 116. – P. 827–835.
50. Circulating leucocyte telomere length and oxidative stress: A new target for statin therapy / S. Saliques // *Atherosclerosis*. – 2011. – Vol. 219, № 2. – P. 753–760.
51. Cawthon, R. Telomere measurement by quantitative PCR // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – e47.
52. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths / M. Kimura [et al.] // *Nature Protocols*. – 2010. – Vol. 5, № 9. – P. 1596–1607.
53. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program / J. Choi [et al.] // *PLoS. Genet.* – 2008 – Vol. 4. – e10.
54. Dissecting the non-canonical functions of telomerase / E. Parkinson [et al.] // *Cytogenet. Genome Res.* – 2008. – Vol. 122. – P. 273–280.
55. Overexpression of TERT increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines / C. Tsai [et al.] // *J. Biomed. Sci.* – Vol. 2010 – P. 17–64.
56. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells / K. Sarin [et al.] // *Nature*. – 2005 – Vol. 436 – P. 1048–1052.

Дата поступления статьи 5 декабря 2012 г.

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ ИНБРЕДНЫХ ПОТОМСТВ СВЕКЛЫ СТОЛОВОЙ ПРИ СЕЛЕКЦИИ НА ГЕТЕРОЗИС (обзорная статья)

ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур, РАСХН
Россия, 143080, Московская обл., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14

Введение

Генеративная система свеклы столовой по своему устройству и возможностям переопыления среди овощных корнеплодных растений является наиболее высокопроизводительной. Свекла – выразительный перекрестник. Кроме опыления пыльцой других растений (ксеногамия) у свеклы наблюдается опыление пыльцой других цветков в пределах одного растения (гейтеногамия) и пыльцой своего цветка (аутогамия).

Цветение начинается через 50–60 суток после посадки маточных корнеплодов. Соцветие – колос, цветки обоеполые, пятичленные мелкие, зеленые, красноватые или беловатые, одиночные или по два–пять и более, впоследствии образующие соплодия клубочки.

Сначала закладывается центральный цветок, затем у его основания второй, третий и т.д. Прицветники линейно-ланцетные, длиннее соплодий. Одиночные цветки можно найти в пазухах боковых ветвей или же на верхушках цветущих осей, особенно на осях второго и третьего порядков. Околоплодник чашеобразный сросшийся с завязью, затвердевающий при плодах, в начале цветения широко раскрытый, а после опыления и перед созреванием сходящийся над плодом. Тычинок 5, тычиночные нити такой же длины или короче, чем доли околоплодника. Завязь полунижняя, развивается наполовину из цветоложа, а верхняя куполообразная ее часть образуется за счет плодолистиков. Рыльце трех-, иногда двухлопастное, почти сидячее. Попав на рыльце пестика, пыльца прорастает через 10–15 минут, а через несколько часов происходит оплодотворение [1].

В настоящее время одно из приоритетных направлений селекции свеклы столовой – получение гетерозисных межлинейных гибридов. Наибольший эффект гетерозиса достигается при максимальной гибридности

потомства. Перспективным направлением для достижения этой цели является использование различных генетических систем размножения растений, в частности цитоплазматической мужской стерильности. Благодаря ЦМС обоеполое растение свеклы превращается в однополое – функционально-женское, что исключает кастрацию цветков при гибридизации.

Впервые явление стерильности на растениях свеклы сахарной описано в 1928 году соотечественником В. Фаворским [2]. Позднее о «стерильных расах», выделенных среди инцухт-линий этой культуры, и полученных с их участием гибридах, сообщил в 1939 году О.Ф. Гельмер [3]. В США первую информацию о цитоплазматической стерильности (ЦМС) сахарной свеклы опубликовал F.W. Owen в 1942 году, где описал ядерную и цитоплазматическую стерильность пыльцы [4].

Проявление признака ЦМС на семенных растениях свеклы сахарной носит различный характер: от отдельных пыльников в цветке до полностью стерильных растений. С.И. Малецкий [5] объясняет это наличием двух типов митохондриальной ДНК, соответствующей известным N- и S- типам цитоплазмы сахарной свеклы. В процессе клеточных делений происходит перераспределение митохондрий и возникает разнокачественность тканей (гетероплазмия). Данное явление отмечено и на свекле столовой.

В инбредном потомстве фертильного растения возможно появление генотипов с различной степенью ЦМС. Возникновение полностью стерильных растений генотипа Sxxxz может происходить в результате гомозиготизации при инбридинге ядерных локусов X-x и Z-z у гетерозиготных растений, а также под действием ядерного гена-мутатора, индуцирующего переход N-цитоплазмы в S-состояние

у фертильного генотипа $Nx\text{h}z\text{z}$ [5]. Появление в инбредном потомстве частично-стерильных растений автор связывает с явлением гетероплазмии. Варьирование в соотношении оргanelл двух типов (N и S) в клеточной популяции материнских клеток микроспор создает изменчивость признака мужской стерильности в потомствах отдельных растений независимо от степени их стерильности. Если предположить, что частично-стерильное растение имеет генотип $(aN + bS)x\text{h}z\text{z}$, где $a < b$, то в его инбредном потомстве должны встречаться стерильные ($a = 0$), частично-стерильные ($a < b$) и фертильные растения ($a > b$).

По мнению ряда ученых у ЦМС-растений сахарной свеклы нарушены поздние этапы формирования пыльцы [6, 7, 8, 9]. В фертильных пыльниках после распада тетрад секреторный тапетум постепенно перерождается в плазмодиальный и равномерно выстилает стенки пыльников, питая микроспоры. Микроспора

увеличивается, накапливает большое количество питательных веществ (сахаров, ферментов, витаминов, каротиноидов), после чего тапетум постепенно лизирует, вокруг микроспоры начинают возникать собственные оболочки и она превращается в пыльцевое зерно. Фертильные пыльники и пыльцевые зерна окрашиваются в желтый цвет за счет каротиноидов, переходящих из тапетума. В стерильных пыльниках, начиная с распада тетрад, происходит постепенное разрушение клеток секреторного тапетума и неравномерное образование периплазмодия, в результате чего нарушаются цитоплазматические связи между клетками тапетума и микроспорами. Достигнув диаметра 10–13 мкм, микроспора прекращает свое дальнейшее развитие, происходит постепенное отслаивание цитоплазмы от стенок и лизирование. От микроспор остаются слипшиеся пустые оболочки. Пыльники стерильных растений свеклы сахарной белые, слегка зеленоватые.

Особенности проявления признака ЦМС у свеклы столовой

При изучении проявления признака ЦМС у свеклы столовой наблюдается широкий спектр окраски пыльников стерильных растений – от прозрачных до частично или полностью окрашенных в различные оттенки красного, что является удобным маркерным признаком при опре-

делении степени стерильности растения [1, 11, 12]. Красящим веществом служит характерный только для данной культуры красный пигмент бетанин, с пиком поглощения при длине волны 530 нм (рис. 1), который начинает накапливаться в стерильных пыльниках еще в бутонах.

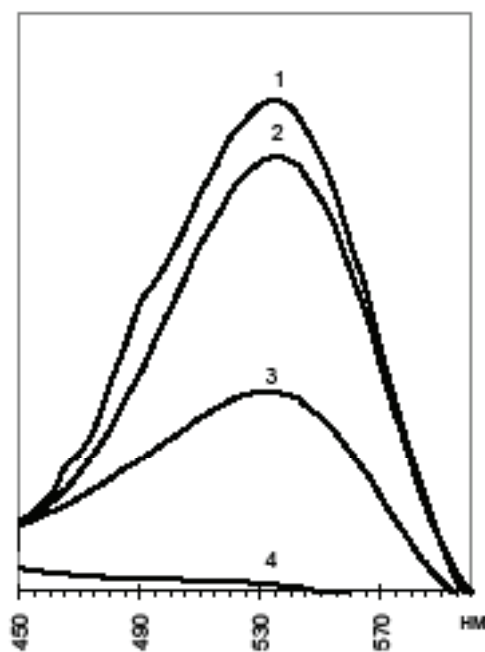


Рис. 1. Спектры поглощения водных вытяжек корнеплода и пыльников свеклы столовой ($\lambda = 450\text{--}600\text{нм}$): 1 – корнеплод; 2 – темно-бордовые ms-пыльники I группы; 3 – розово-красные ms-пыльники II группы; 4 – желтые mf-пыльники

По характеру окрашивания различных частей стерильных (ms) пыльников выделены четыре фенотипические группы (рис. 2), в каждой из которых соответственно варьирует интенсивность их окраски:

I – не окрашены – прозрачные, слегка зеленоватые или сероватые пыльники (по типу сахарной свеклы);

II – окрашены равномерно – все части пыльника имеют одинаковую розовую, крас-

ную, бордовую, коричневую окраску с широким спектром оттенков;

III – окрашены неравномерно – наиболее ярко в различные оттенки от розового до бордового окрашена центральная часть пыльника в районе связника, половинки окрашены менее интенсивно либо частично;

IV – окрашен только связник пыльника – от бледно-розового до красного цвета, остальная часть имеет бледно- или ярко-желтую окраску.

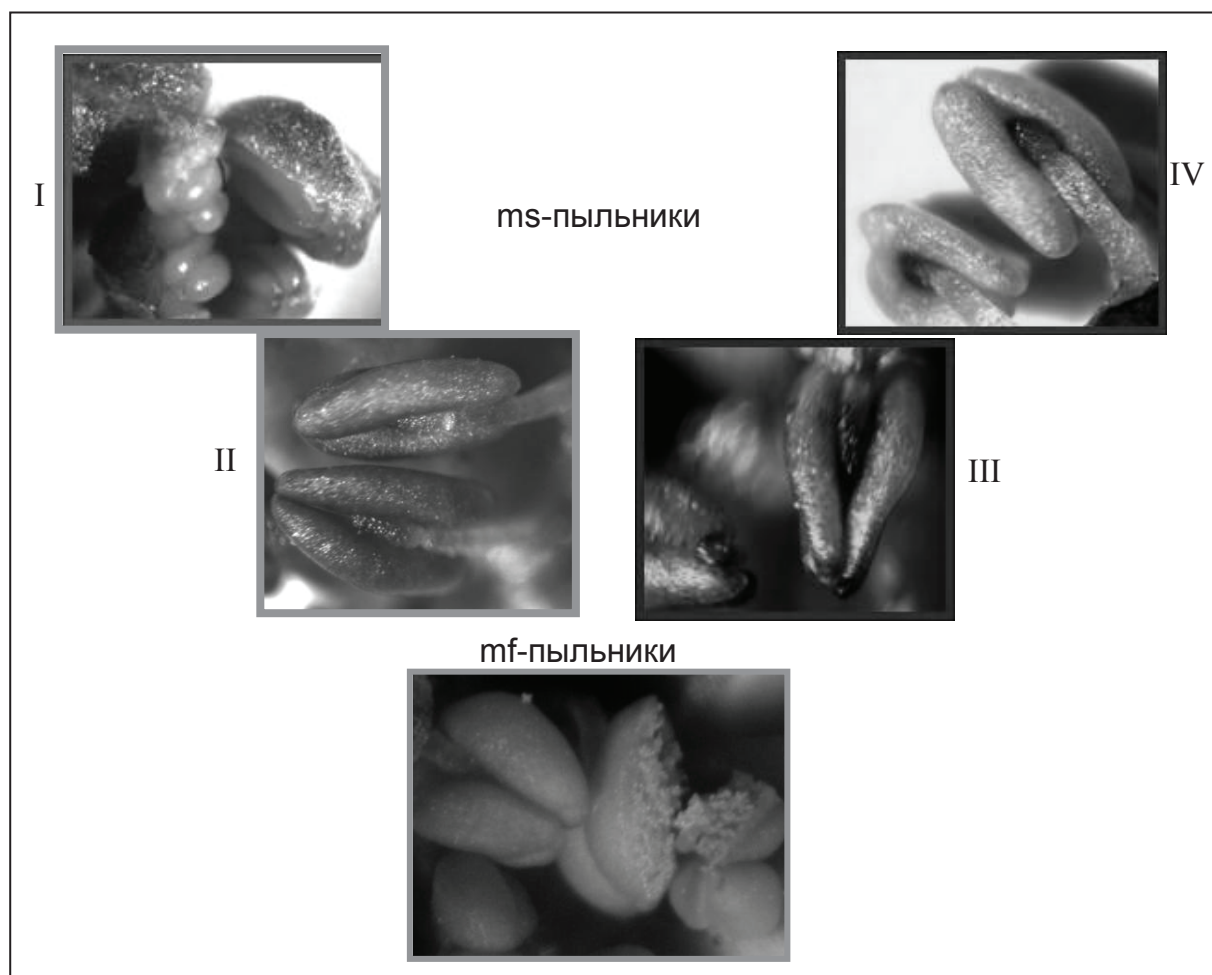


Рис. 2. Группы пыльников по степени и характеру их окрашивания

В трех последних группах отмечена определенная взаимосвязь степени окраски с диаметром ms-пыльников, наличием в них пыльцевых зерен и стерильностью пыльцы: по мере снижения интенсивности окраски пыльника диаметр пыльника и число пыльцевых зерен в нем возрастает, а стерильность пыльцы снижается. При этом средний диаметр пыльцы в зависимости от интенсивности окраски изменяется несущественно; меньшим диаметром

характеризуются только единичные пыльцевые зерна пыльников II группы окраски (табл. 1).

Признак ЦМС в пределах индивидуального растения проявлялся по-разному:

- различное соотношение стерильных и фертильных пыльников (4:1; 3:2; 2:3) внутри одного цветка;
- отдельные, полностью стерильные цветки (от 1 до 3 штук) в соцветиях;

- отдельные ветви (преимущественно центральные ветви первого порядка), несущие только стерильные цветки;
- полностью стерильное растение имеет все ms-пыльники ($C_{ms}=100\%$).

Таблица 1

Изменение параметров пыльцы и ms-пыльников свеклы столовой в зависимости от интенсивности и группы их окраски

Группа	ms-пыльник		Пыльца		
	Характер окрашивания, интенсивность окраски	Средний диаметр, мм	Продуктивность, шт/пыльник	Средний диаметр, мкм	Стерильность, %
I	Не окрашен:				
	<i>Прозрачные, слегка зеленоватые</i>	0,43 ± 0,08	Нет пыльцы	–	100
II	Окрашены равномерно все части пыльника:				
	<i>Темно-бордовый</i>	0,46 ± 0,12	Нет пыльцы	–	100
	<i>Темно-коричневый</i>	0,48 ± 0,05	Пустые оболочки	–	100
	<i>Красный, темно-розовый</i>	0,62 ± 0,14	72 ± 31	37,3 ± 2,8	100
III	Окрашен неравномерно – более интенсивно в районе связника:				
	<i>Связник темно-бордовый</i>	0,74 ± 0,07	170 ± 56	46,3 ± 1,2	100
	<i>Связник красно-бордовый</i>	0,85 ± 0,05	255 ± 94	41,5 ± 5,7	100
	<i>Связник темно-розовый</i>	0,91 ± 0,09	560 ± 115	46,1 ± 4,4	100
IV	Окрашен только связник:				
	<i>От красного до бледно-розового</i>	0,95 ± 0,25	740 ± 136	45,1 ± 7,6	90–94

Для получения форм с ЦМС используют метод инбридинга. Самоопыление позволяет получить ряд линий, гомозиготных по отдельным признакам, которые наряду с депрессией обладают ценными качествами [14]. Установлено, что если растения свеклы сахарной имеют стерильную цитоплазму, то их потомства от самоопыления дают свободное расщепление на полностью стерильные, частично стерильные и фертильные растения [15, 16].

При оценке различных инбредных потомств на ЦМС учитывают степень стерильности индивидуальных растений (C_{ms} – процент ms-цветков),

которая варьирует в пределах $1 \leq C_{ms} \leq 100\%$. У растений со степенью стерильности до 20%, отдельные ms-цветки располагаются в верхней части соцветий, чаще всего на ветвях второго порядка; со степенью стерильности 30–70%, имеются как полностью стерильные ветви, так и отдельные ms-цветки на фертильных ветвях. Растения со степенью стерильности 80–90% характеризуются наличием в стерильных соцветиях отдельных фертильных цветков на ветвях любых порядков. У полностью стерильных растений ($C_{ms}=100\%$) пыльники всех цветков имеют маркерные признаки ЦМС [12, 13].

Признак ЦМС в инбредных потомствах различного происхождения

При сравнительной оценке характера проявления признака стерильности в инбредных потомствах, полученных из сортовых и гибридных популяций, отмечены определенные особенности (табл. 2). Семенные растения сортовой популяции, не зависимо от степени

стерильности, имели равномерно окрашенные пыльники (красные, коричневые). У инбредных потомств с разной степенью стерильности, полученных из гибридных популяций, этот признак варьирует.

Таблица 2

Проявление мужской стерильности на семенных растениях инбредных потомств свеклы столовой и качественная характеристика пыльцы mf-цветков

Инбредное потомство	Сms, %	Группа окраски пыльников				Пыльца mf-цветков			
		I	II	III	IV	Фертильная			Стерильная, %
						Диаметр, о-мкм	Жизнеспособность, %	Длина пыльцевой трубки, о-мкм	
Сортовая популяция									
274/1-2-15	100	–	+	–	–	–	–	–	100
274/1-7-3	50	–	+	–	–	53 ± 4	3	314 ± 47	8
274/1-7-1	40	–	+	–	–	61 ± 8	20	475 ± 33	27
274/2-2-10	15	–	+	–	–	56 ± 15	28	462 ± 51	6
274/5-6-12	10	–	+	–	–	60 ± 11	32	472 ± 38	26
Гибридные популяции									
300/1-4-5	100	+	+	–	–	–	–	–	100
300/1-3-1	80	–	+	+	+	49 ± 3	0	0	85
300/1-3-3	60	–	+	+	+	53 ± 4	5	538 ± 39	47
305/3	30	–	+	+	–	56 ± 7	37	605 ± 52	8

Полностью стерильные семенные растения отличались наличием цветков с прозрачными или полностью окрашенными стерильными пыльниками (преимущественно красные или розовые); пыльники в цветках растений со степенью стерильности (60–80%) характеризовались равномерной и неравномерной окраской (розовые, красные, темно-бордовые), а также наблюдали пыльники, окрашенные только в зоне связника. Растения со степенью стерильности 30% характеризовались наличием в цветках равномерно и неравномерно окрашенных пыльников (розовые, красные).

Степень стерильности влияет на функциональные параметры пыльцы mf-цветков частично-стерильных растений (табл. 2). В потомствах, полученных на основе гибридных популяций, отмечен рост числа стерильных пыльцевых зерен в фертильных цветках по мере увеличения Сms растения; в потомствах, полученных из сортовой популяции, подобной закономерности не наблюдается [12, 13].

С увеличением степени стерильности инбредных растений I₁–I₂ уменьшаются диаметр и жизнеспособность фертильной пыльцы mf-цветков ($r = -0,84$ и $r = -0,88$ соответственно),

снижается скорость роста пыльцевой трубки ($r = -0,85$) [12]. В потомствах, полученных на основе гибридных популяций, при увеличении Сms с 30 до 60% диаметр фертильных пыльцевых зерен снизился на 5%; жизнеспособность пыльцы – на 32%; а длина пыльцевой трубки – на 11%. У растения с Сms-80% количество фертильной пыльцы, которая не проросла, в среднем составляло 15%. В потомствах, полученных из сортовой популяции, увеличение Сms с 15 до 50% также приводило к снижению аналогичных параметров: диаметра пыльцевых зерен на 5%, жизнеспособности пыльцы на 25%, длины пыльцевой трубки на 32% (табл. 2).

В инбредных потомствах I₃–I₄ средние значения изучаемых параметров пыльцы в группах ms-растений достоверно отличаются от групп mf-растений, но характер отмеченных ранее взаимосвязей изменяется. В группе инбредных ms-растений гибридных популяций сохраняются тесные связи между степенью стерильности растений и параметрами пыльцы mf-цветков, тогда как в инбредном потомстве сортовой популяции большинство связей значительно ослабевает: Сms/стерильность $r = 0,79$ и $r = 0,65$; Сms/диаметр пыльцевых зерен $r = -0,88$ и $r = -0,25$; Сms/

жизнеспособность $r = 0,64$ и $r = -0,13$; Смс/длина пыльцевой трубки $r = -0,67$ и $r = 0,20$ соответственно. Исходя из общеизвестного толкования генетического контроля ЦМС свеклы сахарной, предполагаем, что такое фенотипическое прояв-

ление ЦМС и взаимосвязей функциональных параметров, обусловлены перестройкой генотипа и влиянием депрессии в расщепляющихся инбредных потомствах, что в свою очередь влияет и на их репродуктивную способность.

Семенная продуктивность инбредных потомств свеклы столовой при различных способах размножения

В результате анализа семенной продуктивности отмечены некоторые различия между потомствами различного происхождения. В потомствах сортопопуляции наибольшую долю (48%) от числа изученных составляли растения с урожаем семян менее 5 г/раст., из них у 26% получено семян до 1 г/раст. Наряду с низкопродуктив-

ными биотипами у 24% растений урожай семян составил более 30 г/раст. В потомствах гибридных популяций у большинства растений (41%) получено 5–15 г/раст.; 13% растений – с урожаем семян менее 1 грамма. Остальные растения сформировали до 30 граммов семян, а с одного растения получено 55 граммов (табл. 3).

Таблица 3

Структура инбредных потомств по семенной продуктивности растений

Популяции	Процент растений с продуктивностью семян					
	≤ 1,0 г	1,1–5,0 г	5,1–15,0 г	15,1–30,0 г	30,1–60,0 г	> 60,0 г
Сортовая	26	22	12	16	14	10
Гибридные	13	26	41	19	1	0

При сравнительной оценке семенной продуктивности биотипов с различной степенью мужской стерильности установлено, что при самоопылении продуктивность растений с признаком ЦМС значительно ниже, чем фертильных растений, независимо от происхождения, при этом как среди частично-стерильных, так и среди фертильных биотипов встречаются низкопродуктивные растения и растения, завязавшие

достаточное количество семян [12]. В потомствах сортопопуляции способность завязывать семена при самоопылении отмечена у растений, стерильность которых не превышала 15%. Растения со степенью стерильности 20–90% не завязывали семена. В гибридных потомствах завязываемость семян при самоопылении наблюдали как у растений с низкой стерильностью, так и у растений, стерильность которых достигала 80% (рис. 3).

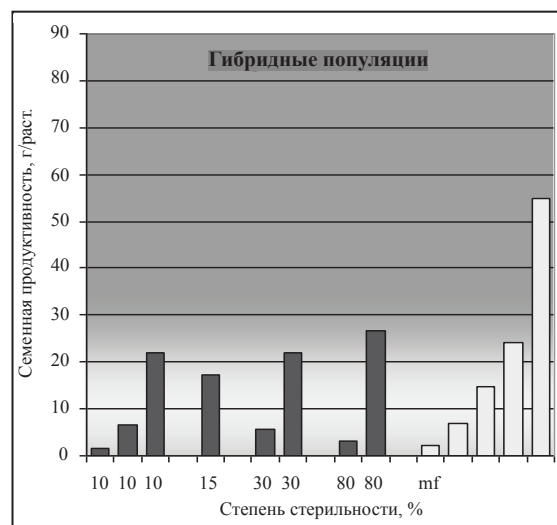
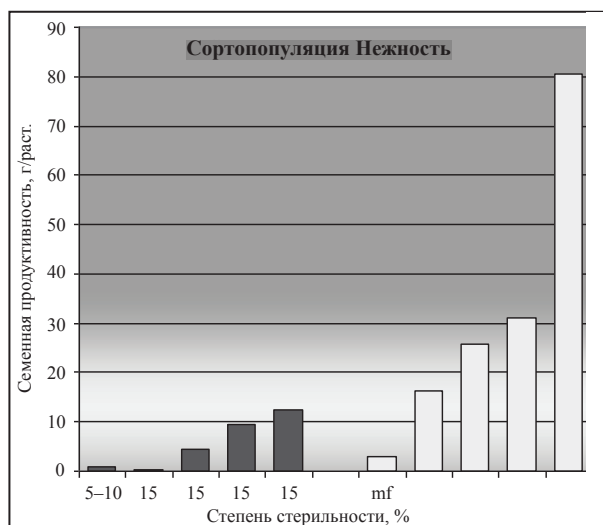


Рис. 3. Семенная продуктивность растений инбредных потомств (двухлетняя культура)

При выращивании растений через культуру штеклингов по схеме: посадка маточных корнеплодов (февраль) → получение инбредных семян I_1 и их посев для выращивания штеклингов (I–II декада июля) → уборка и яровизация штеклингов (ноябрь–февраль) → посадка ште-

клингов (февраль) → получение инбредных семян I_2 (I–II декада июля), получены несколько другие результаты (рис. 4). В инбредных потомствах всех популяций способность завязывать семена отмечена у частично стерильных растений со степенью стерильности 10–90%.

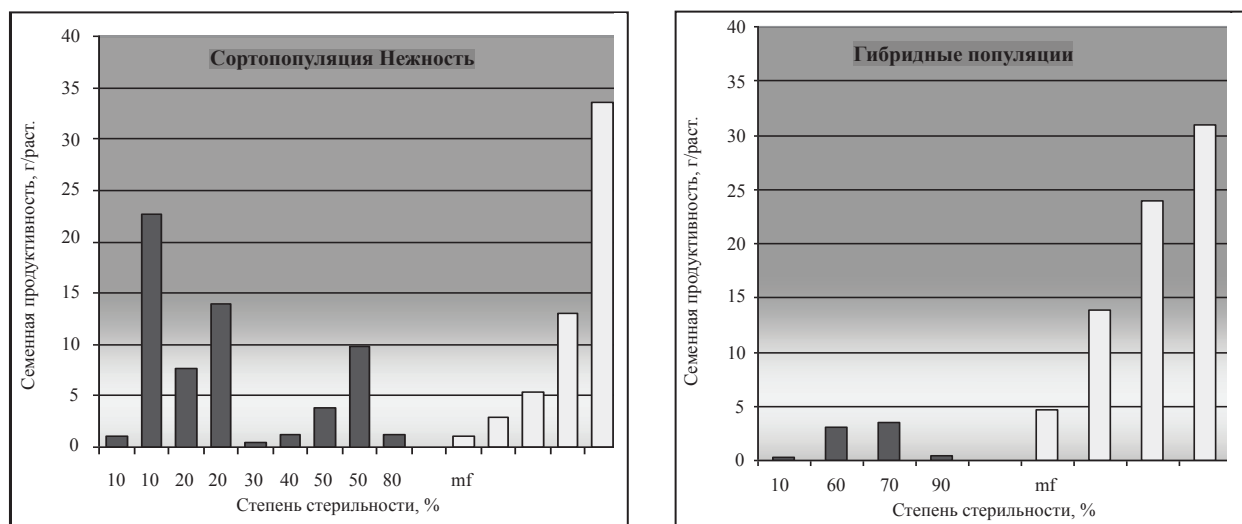


Рис. 4. Семенная продуктивность растений инбредных потомств (культура штеклингов)

В сортовой популяции семенная продуктивность частично-стерильных растений по средним показателям даже выше, чем растений со стерильностью 5–15%, полученных через двухлетнюю культуру. В группе фертильных биотипов сортопопуляции происходит снижение семенной продуктивности, по сравнению с

двухлетней культурой. В потомствах гибридных популяций, наоборот, по сравнению с растениями, полученными через двухлетнюю культуру, отмечено снижение семенной продуктивности частично-стерильных растений и увеличение этого показателя в группе mf-растений, полученных через культуру штеклингов (табл. 4).

Таблица 4

Сравнительная оценка инбредных потомств по семенной продуктивности при разных технологиях выращивания

Продолжительность цикла выращивания	Значение признака	Семенная продуктивность, г/растения			
		Сортопопуляция		Гибридные популяции	
		Частично-стерильные растения	mf-растения	Частично-стерильные растения	mf-растения
Двухлетний (корнеплоды)	Среднее	3,6	23,6	9,9	9,3
	min-max	0,2–12,4	0,5–94,0	0,5–26,5	0,3–55,0
Однолетний (штеклинги)	Среднее	6,0	6,2	1,8	13,9
	min-max	0,24–22,7	0,62–33,6	0,3–3,5	2,1–31,2

Использование защищенного грунта для культуры штеклингов свеклы столовой вполне оправдано для ускорения селекционного процесса и

является одним из способов создания инбредных потомств свеклы столовой, что дает возможность получать семенной материал у биотипов

с различным проявлением ЦМС, а также поддерживать фертильные инбредные потомства.

Высокая вариабельность параметра «семенная продуктивность» свеклы столовой, вероятно, объясняется системой самонесовместимости. Как считает Балков И.Я., на семенных растениях свеклы самонесовместимость может иметь различную степень выраженности; завязываемость семян составляет от нуля до

нескольких сотен [17]. Растения, завязавшие до 50 семян автор относит к самостерильным, от 100 семян и выше – определяет как склонные к самофертильности. Также было установлено, что признак самофертильности сохраняется в потомстве.

Как видно на рис. 5, у большинства растений в I_2 произошло снижение семенной продуктивности (на 0,7–33,2 г/растение).

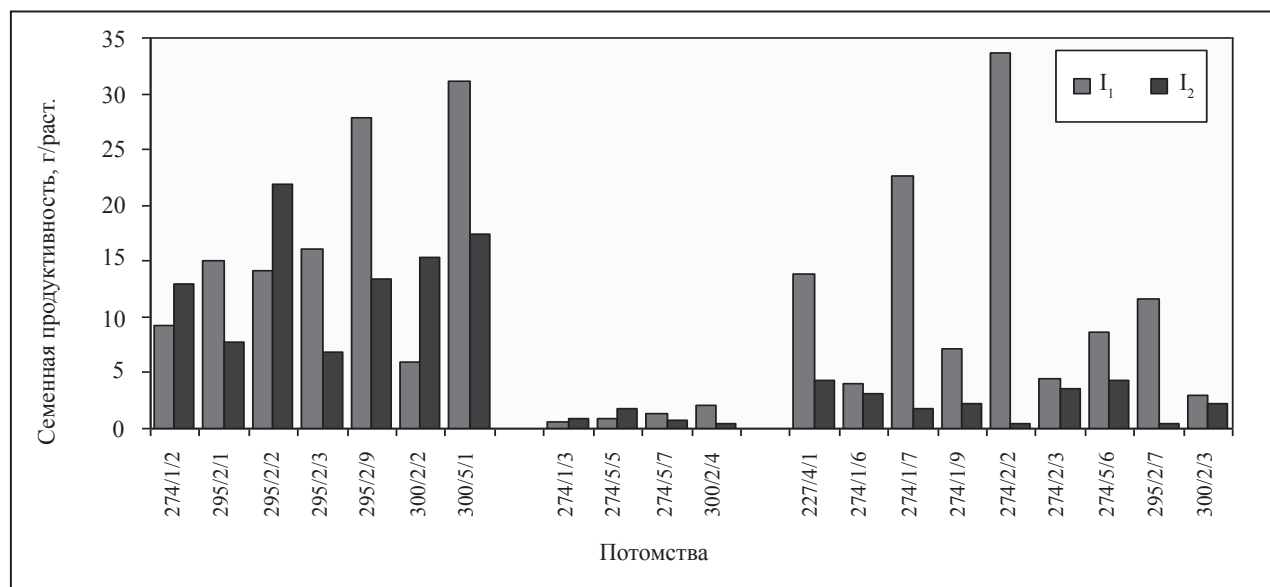


Рис. 5. Семенная продуктивность растений инбредных потомств (I_1 – I_2)

Однако были выделены потомства 274/1/2; 295/2/1; 295/2/2; 295/2/3; 295/2/9; 300/2/2; 300/5/1, в которых растения завязали достаточное количество семян как в первом (9,3–31,2 г/растение) так и во втором (6,8–21,9 г/растение) инбредных поколениях. Данные потомства мож-

но характеризовать как склонные к самофертильности. Потомства 274/1/3; 274/5/5; 274/5/7; 300/2/4 характеризовались стабильно низкой семенной продуктивностью (0,4–2,1 г/растение), не зависимо от поколения инбридинга и условий выращивания, и отнесены к самостерильным.

Заключение

Таким образом, для селекционной работы при создании гетерозисных гибридов свеклы столовой к перспективным относятся самофертильные потомства частично-стерильных и *mf*-растений, способные стабильно формировать достаточное количество семян (> 5 г) в разных поколениях ин-

бридинга, а также потомства со стабильно низкой семенной продуктивностью (< 2 г).

Использование культуры штеклингов позволяет не только ускорить селекционный процесс, но и увеличить выход генетически разнообразного инбредного материала.

Список использованной литературы

1. Еременко, Л.Л. Морфологические особенности овощных растений в связи с семенной продуктивностью. – Новосибирск: Наука, 1975. – 470 с.
2. Фаворский, В. – Тр. ВНИС. – Вып. 2. – 1928.
3. Гельмер, О.Ф. Основные выводы из работ свекловичной секции Ивановской станции за 1937 г. // Основные выводы научно-исследовательских работ ВНИС за 1937 г. – М.–Л.: Пищепроиздат, 1939. – С. 288–292.
4. Owen, F.W. Cytoplasmically inherited

malt sterility in Sugar beets // Journ. Of Agris. Research. – 1945. – V. 71, № 10. – P. 423–440.

5. Малецкий, С.И. Варьирование цитоплазматически контролируемой стерильности пыльцы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) и ее связь с гетероплазмией митохондрий в клетках // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 11. – С. 1461–1467.

6. Артшвагер, Е. Дегенерация пыльцы у сахарной свеклы с мужской стерильностью в связи с развитием тапетального плазмодия // Стерильность сахарной свеклы: Сб. переводов. – М., 1964. – С.91–97.

7. Зайковская, Н.Э. Достижения науки и передового опыта по свекле.–М.: Сельхозгиз, 1961. – С. 8–11.

8. Зайковская, Н.Э. Изучения микроспорогенеза и развитие семян у сахарной свеклы с ЦМС // Селекция растений с использованием ЦМС.– Киев: Урожай, 1966. – С.354–368.

9. Атабекова, А.И. Цитология растений / А.И. Атабекова, Е.И. Устинова. – М.: Колос, 1971. – С. 136–151.

10. Заячковский, В.А., Селин, И.В., Старцев, В.И. Исследование мужского гаметофита свеклы столовой // Гетерозис с.-х. растений. Международный симпозиум. – М., 1997. – С.110–112.

11. Балашова, Н.Н., Заячковский, В.А., Старцев, В.И. Разработка элементов гетерозисной селекции столовой свеклы // Гавриш. – 1999. – № 3. – С. 24–25.

12. Федорова, М.И., Ветрова, С.А., Козарь, Е.Г. Особенности фенотипического проявления признака ЦМС семенных растений свеклы столовой. // Овощи России. – 2011. – 3 (12). – С. 18–23.

13. Ветрова, С.А. Оценка и отбор исходного материала для селекции на гетерозис свеклы столовой (*Beta vulgaris* L.). / Автореф. дис ... канд. с.-х. наук.– М., 2011.– 25 с.

14. Ващенко, Т.Г. Создание и использование самоопыленных линий сахарной свеклы в селекции на гетерозис / Автореф. дис ... канд. с.-х. наук. – Л.: ВИР, 1986. – 17 с.

15. Owen, F.W. Cytoplasmikalli inherited male-sterility in sugar beets. // J. Agric. Res. – № 71. – 1975.

16. Бабьяж, И.А. К вопросу использования инцухт-линий у сахарной свеклы для получения форм с ЦМС // В кн.: Селекция растений с использованием цитоплазматической мужской стерильности. – Киев, 1966.

17. Балков, И.Я. Селекция сахарной свеклы на гетерозис. – М.: Россельхозиздат, 1978. – 166 с.

Дата поступления статьи 13 ноября 2012 г.

ИДЕИ Н.В. ТУРБИНА ДЛЯ РАЗВИТИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РАБОТ СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА (обзорная статья)

Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААН Украины
Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дорога, 3

Чтобы понять влияние Николая Васильевича Турбина на исследования по генетике сельскохозяйственных растений в нашем институте, кстати, который в этом году также официально отмечает свой 100-летний юбилей, следует в общих чертах остановиться на его предыстории. За это время институт прошел несколько принципиально различающихся этапов в направленности своих работ. Но все годы своего функционирования институт занимал лидирующие позиции среди аграрных учреждений (и по результативности селекции, и в теоретическом отношении) как бывшего СССР, так и в независимой Украине.

В 1912 году при Одесском опытном поле (основанном Южнороссийским товариществом сельского хозяйства в 1895 году) был организован отдел селекции, руководство которым было поручено Андрею Афанасьевичу Сапегину. И с этого времени начинается история селекционно-генетического института как научного учреждения. На базе данного селекционного отдела в 1918 году была организована Одесская селекционная станция, которая в 1928 году была преобразована в Украинский генетико-селекционный институт (УГСИ) (позже Всесоюзный селекционно-генетический институт ВАСХНИЛ, а теперь Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААНУ). Непростой путь, который пришлось пройти институту за 90 лет, детально описан академиком НААНУ С.Ф. Лыфенко [1]. А история отдела генетики, как самостоятельного научного подразделения, началась с 1928 года, то есть со времени образования УГСИ.

Один из непревзойденных ученых своего времени А.А. Сапегин, как руководитель науч-

ного учреждения, с самого начала его организации полностью осознавал, что достижения в селекционной работе неразрывно связаны с генетическими исследованиями. Уже в первые годы он ярко заявил о себе опубликованной книгой о роли генетики для развития селекции сельскохозяйственных растений [2] и сборником статей по генетике [3]. На протяжении всех лет селекционной работы он (позже вместе с сыном Л.А. Сапегиным и рядом сотрудников) интенсивно занимается генетическими исследованиями, о чем свидетельствуют его отдельные статьи. Впоследствии они были изданы в сборнике его работ [4] и имеют прямое отношение к цитологическому и генетическому (гибридологическому) анализам, изучению внутривидовых и отдаленных гибридов пшениц, получению и характеристике рентгеномутаций мягкой и твердой пшениц, а также взаимоотношениям хромосом, расщепления и гибридной мощности.

Послесапегинский период генетических исследований в институте (как и в стране в целом) проходит под влиянием господства так называемой «мичуринской биологии». Основным направлением исследований становится «управление наследственностью путем воспитания несвойственными условиями внешней среды» – то есть главным образом, «переделки», или «направленное изменение» яровых культур в озимые и, наоборот, озимых в яровые путем посевов их в несвойственные сроки для «расшатывания и воспитания» наследственности. После «знаменитой» августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 года (31 июля–7 августа) это направление становится доминирующим не только в институте, но и в большинстве селекционно-генетических учреждений всего СССР.

К сожалению, полное неприятие хромосомной теории наследственности, ошибочное идеологическое (философское) обоснование и жесткое административное давление на длительное время затормозили прогресс в данном направлении.

Пленум ЦК КПСС 14 октября 1964 года осудил субъективизм в руководстве наукой и обществом, предусмотрев мероприятия по преодолению отставания в биологической и аграрной науке. Одним из первых шагов в данном направлении была переквалификация преподавателей кафедр генетики всех университетов страны. На базе МГУ в феврале–марте 1965 года для них были организованы курсы лекций и практические занятия по разным направлениям классической генетики. Для обучения привлекаются отечественные генетики высшей квалификации. Изменяются программы генетических курсов в университетах и аграрных вузах, постепенно пересматриваются тематики генетических работ в исследовательских учреждениях.

В 1967 году академиком-секретарем отделения растениеводства и селекции ВАСХНИЛ назначается новоизбранный академик Н.В. Турбин (до этого академик АН БССР, директор ИГЦ и заведующий кафедрой дарвинизма и генетики БГУ). Вместе с ним руководство ВСГИ принимает решение о дальнейшем усилении и совершенствовании генетического направления в институте. На должность заведующего отделом генетики (по согласованию с сельхозотделом ЦК КПСС и ВАСХНИЛ) приглашается с кафедры дарвинизма и генетики БГУ ученик Н.В. Турбина, автор данной статьи А.Ф. Стельмах, первоочередной задачей которого предполагается повышение генетической грамотности сотрудников всего института и постепенная перестройка научных программ.

В своем напутствии Н.В. Турбин высказал две рекомендации, сыгравшие основную роль для последующей работы: первое - для убеждения сотрудников института в правильности хромосомной теории наследственности развернуть исследования по использованию явления анеуплоидии у пшеницы, тогда входившего в моду направления исследований. Что же касается прежней тематики – не просто прекратить эти работы, а попытаться в методически чистых экспериментах проде-

монстрировать их «результативность», разобраться в механизмах выявляемых прежними авторами изменений, и ни в коем случае «не выплеснуть из шайки вместе с грязной водой и ребенка (истины)». Эти рекомендации и стали отправной точкой нашей дальнейшей работы, и именно они сыграли основную роль в дальнейшем становлении и развитии генетических исследований не только в отделе генетики, но и во всем институте.

Начав работу с повышения генетической грамотности сотрудников института (для аспирантов и всех сотрудников института читаются лекции, проводятся семинарские занятия..., кстати, на протяжении 3 лет мы были привлечены и к ведению курса генетики на 3 отделениях двух факультетов Одесского сельскохозяйственного института), сразу же была осуществлена попытка перевести исследования по «переделкам и инъекциям» на методически безукоризненную основу: соблюдение генетической чистоты исходного материала, исключение засорения, устранение (или учет) действия отбора и эффектов спонтанного мутагенеза и т.д. Для проведения этих работ из выпускников БГУ были приглашены научная сотрудница А.И. Синкевич и аспирантка С.Ф. Лукьянюк.

Для оценки эффективности «переделок» яровых пшениц в озимые в качестве исходного материала были избраны линии яровой пшеницы, прошедшие длительное поддержание путем самоопыления под изоляторами при их цитологическом контроле (дисомные выщепенцы из набора моносомных линий пшеницы Chinese spring). Осенние посевы их осуществлялись в разные сроки в холодном парнике, для предотвращения гибели (действия отбора) в течение зимы использовали утепление соломенными матами, при колошении применяли искусственную изоляцию пергаментными изоляторами. Подобное «воспитание» в течение нескольких сезонов не привело в результате к получению озимых потомков! Следовательно, основными причинами выявления подобных «изменений» другими авторами могли быть не учитываемые ими генетическая неоднородность исходного материала (механическое и/или биологическое засорение), спонтанная гибридизация (возможное

перекрестное опыление) при совмещении сроков цветения посеянных осенью яровых и размещенных по соседству озимых генотипов, спонтанный мутагенез.

Первая причина была устранена в наших опытах выбором линейного материала. Возможность второй была подтверждена впоследствии выявлением возрастания частоты открытого цветения пшениц при посевах в необычные сроки, достоверной частотой выявления в потомстве маркерных признаков от материала из соседних посевов (в том числе и при ретроспективном анализе компонентного состава запасных белков эндосперма во многих полученных ранее другими авторами «яровых линиях» из озимой Мироновской 808). Однако и эта причина была исключена в наших опытах применением искусственной изоляции. Что касается возможности спонтанного мутагенеза генов типа развития, то она представляется сомнительной при «переделках» озимых в яровые (требуется мутация рецессивного гена в доминантный, что маловероятно), обратный же процесс мутации доминантного гена яровости в рецессивный озимости теоретически возможен, но его вероятность оказалась на порядки ниже по сравнению с констатируемыми прежними авторами частотами «переделок». Хотя сам процесс некоторого достоверного повышения частот спонтанного мутирования маркерных генов при посевах в несвойственных условиях был подтвержден на классическом тесте ячменя *waхu*. Кстати, этот же тест позволил выявить также и достоверный мутагенный эффект дополнительного чужеродного опыления.

Работы по «переделкам» потребовали детального изучения генетики различий пшеницы по типу развития (озимость/яровость). Используя как тестеры полученный из Австралии набор почти изогенных по *Vrn*-локусам линий пшеницы Triple Dirk, были созданы аналогичные полные наборы по 8 гомозиготных линий (3 локуса с двумя аллелями) в генофоне 6 озимых сортов, идентифицированы генотипы около 1500 образцов мировой коллекции, показаны зональные различия географии конкретных аллелей и генотипов, свидетельствующие об их неодинаковой селекционной ценности. Охарактеризовать ее было возможным, лишь оценив величины эффектов конкретных генов

по основному признаку скорости развития и сопряженным с нею селектируемым элементам структуры урожая.

В этом существенную помощь оказал опыт работы по анеуплоидии пшениц, позволяющий определять эффекты отдельных хромосом на уровень развития конкретных количественных признаков (по аналогии с анализом замещенных линий, после стажировки в Plant Breeding Institute, Кембридж-Трампингтон, Англия). Используя методы подобных расчетов, были оценены величины эффектов аллелей *Vrn*-генов по дате колошения, элементам структуры и конечному урожаю в оптимальных и моделируемых условиях фитотрона и естественных условиях Одессы и Тюмени. Далее работы строились по аналогичной схеме у твердой пшеницы, а у мягкой – было развернуто такое же изучение остальных влияющих на скорость развития озимой пшеницы генетических систем локусов *Ppd* (контроль различий по чувствительности к продолжительности фотопериода), *Vrd* (по продолжительности потребности в яровизации у озимых генотипов) и *Eps* (по скороспелости *per se*, не связанной с фотопериодическими и яровизационными реакциями), причем по последним двум – впервые в мире, об этом шла речь на предыдущей юбилейной конференции ИГЦ НАНБ 2010 года [5, 6]. И все эти работы до сегодняшнего дня интенсивно продолжают в отделе (в т. ч. и по эффектам на уровень морозостойкости) под руководством бывшего аспиранта, теперь уже доктора биологических наук по генетике В.И. Файта.

В работах по анеуплоидии пшеницы помимо создания «своего» анеуплоидного цитологически маркированного материала был использован моносомный анализ ряда интересных селекционером признаков: тип развития, устойчивость к ряду грибных заболеваний, восстановительная способность фертильности при ЦМС, полукарликовость, биосинтез отдельных компонентов запасных белков эндосперма (глиадинов и глютеинов, участвующих в формировании особенностей качества зерна). И именно работа по моносомному анализу различий по последнему признаку постепенно стала основой широкого развития направления так называемой «биохимической генетики» (точнее, генетики биохимических

признаков у сельскохозяйственных культур, или использования генетического разнообразия компонентного состава запасных белков и ферментов как биохимических маркеров различных признаков) не только в институте, а во всей стране и за рубежом. Эта работа придала генетическую направленность исследованиям в институте по качеству зерна и способствовала преобразованию лаборатории качества в отдел генетических основ селекции, который теперь (после А.А. Созинова и Ф.А. Поперели) возглавляет доктор биологических наук по генетике А.И. Рыбалка, осуществлявший ранее как аспирант в отделе генетики выше указанный моносомный анализ компонентного состава запасных белков.

Что касается работ по инъекциям растительных гомогенатов в недозрелые семена гороха (как модификации вегетативной гибридизации), то в методически выдержанных экспериментах было подтверждено превышение в потомстве у реципиента частоты выявления маркерных признаков от донора гомогената (доминант → рецессив) над частотой ненаправленных мутаций. Само повышение частоты ненаправленного мутирования различных генов после инъекций не вызывало сомнения и подтверждалось цитологически возрастанием частот хромосомных перестроек у потомков по сравнению с контролем. Однако достоверная «направленность» в изменении маркерных локусов (донор → реципиент) стимулировала попытку определить активную биохимическую фракцию гомогената, приводящую к такому результату.

Фракционирование гомогената на углеводную, белковую и нуклеиновую фракции и раздельное их инъектирование показало наличие подобного эффекта только в варианте введения нуклеиновой фракции. Данный факт на фоне «нашумевших» в тот период публикаций Д. Хесса по возможности трансформации у растений послужил дополнительным стимулом для организации в институте специальной лаборатории (а затем отдела) по молекулярной генетике вернувшимся со стажировки в США Ю.М. Сиволапом (ныне д.б.н., академик НААНУ). Интенсивное изучение структуры генома у различных видов сельскохозяйственных растений привело к выделению отдела в самостоятельный Южный биотехнологический

центр в растениеводстве (правда, при последней недавней реорганизации аграрной науки в Украине данный центр в полном составе вновь присоединен к СГИ).

С другой стороны, продолжение работ по инъекциям стимулировало идею перевода их на уровень культуры *in vitro*. Как модель предполагалось использовать культуру клеток безалкалоидного люпина для возможного восстановления в регенерируемом потомстве биосинтеза алкалоидов путем введения в культуральную среду нуклеиновой фракции гомогената алкалоидных доноров. И после освоения соответствующих методик у Р.Г. Бутенко в ИФР АН СССР аспирантка отдела С.Ф. Лукьянюк начала разворачивать исследования по культуре растительных клеток и тканей. Правда, со временем работы по «инъекциям» прекратились, зато были широко развернуты разнообразные исследования по возможности использования методик *in vitro* в селекционно-генетических программах института у ячменя, пшеницы, кукурузы, подсолнечника и др.). В результате эти работы привели к организации в институте самостоятельной лаборатории биотехнологии. После преждевременного ухода из жизни С.Ф. Лукьянюк данную лабораторию возглавляет до настоящего времени ее соратница ныне доктор биологических наук С.А. Игнатова.

Таким образом, именно те два указанные выше напутствия Н.В. Турбина (напомню: использование исследований по анеуплоидии пшеницы для убеждения сотрудников в истинности хромосомной теории наследственности и сохранение и перевод на методически безукоризненный уровень прежних исследований «лысенковской направленности» по переделкам и инъекциям растительных гомогенатов) при моем переезде на работу в отдел генетики данного института способствовали не просто повышению общего генетического уровня всех сотрудников. Они привели в результате к кардинальной перестройке теоретической направленности исследований и структуры всего института, позволив ему сохранить ведущие позиции в стране (как в СССР в целом, так и в независимой Украине) в роли координационного центра и по селекции основных сельскохозяйственных культур, и по генетике, и по биотехнологии сельскохозяйственных растений.

Список использованной литературы

1. Лифенко, С.П. Селекційно-генетичний інститут. Нариси з історії / СГІ. – Одесса, 2002. – 122 с.
2. Сапегин, А.А. Законы наследственности, как основа селекции сельскохозяйственных растений. Изложено по книге Е. Вауера «Einführung in die experimentelle Vererbungslehre» / Об-во сельского хозяйства южной России. – Одесса, 1912. – 105 с.
3. Этапы менделизма / Сб. статей под ред. и с предисл. А.А. Сапегина. – Одесса, 1923. – 132 с.
4. Сапегін, А.О. Вибрані праці / Наукова думка – Київ, 1971. – 318 с.
5. Стельмах, А.Ф., Генотипы современных сортов озимой мягкой пшеницы по потребности в яровизации и фоточувствительности / А.Ф. Стельмах, В.И. Файт // Молекулярная и прикладная генетика – Минск, 2010. – 5 с.
6. Стельмах, А.Ф., Файт, В.І., Мощний, І.І., Ламарі, Н.П. Генетичні системи адаптації та розширення різноманіття зернових колосових культур // Зб. наукових праць СГІ-НЦНС – Одеса, 2010. – Вип. 15 (35). – 9 с.

Дата поступления статьи 30 июля 2012 г.

РЕФЕРАТЫ

SUMMARIES

УДК 575/576(476)(092)+929

Хотылева, Л.В., Гончарова, Р.И. Академик Н.В. Турбин – основатель современной белорусской генетической школы / Л.В. Хотылева // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 7–13.

Статья посвящена памяти Н.В. Турбина – академика Национальной академии наук Беларуси, академика Российской сельскохозяйственной академии, лауреата Государственной премии Белорусской ССР, заслуженного деятеля науки Белорусской ССР, выдающегося ученого в области генетики, селекции и растениеводства, основателя школы генетиков Беларуси, создателя Института генетики и цитологии Национальной академии наук и его первого директора. В статье оценивается роль Н.В. Турбина как ученого и организатора науки, который создал институт, определил его основные направления исследований, ясно предвидел перспективу их развития в будущем.

Н.В. Турбин оставил большое наследие в генетической науке и благодарную память в сердцах многих людей.

Ключевые слова: академик Н.В. Турбин.

Khotyleva, L., Goncharova, R. Academician N.V. Turbin – the founder of the modern Belarusian genetic school / L. Khotyleva // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 7–13.

The article is dedicated to the memory of N.V. Turbin – Academician of the National Academy of Sciences of Belarus, Academician of the Russian Agricultural Academy, a State prizewinner of the Byelorussian SSR, a Honoured Science Worker of the Byelorussian SSR, an eminent scientist in the field of genetics, breeding and plant growing, the founder of the school of Byelorussian geneticists, the founder of the Institute of Genetics and Cytology at the National Academy of Sciences of Belarus and its first director. The role of N.V. Turbin as a scientist and an organizer of science who has established the Institute, defined its major research trends and foreseen the prospect of their development in future is estimated in the article.

N.V. Turbin has left the great heritage in genetic science and grateful memories in hearts of many people.

Key words: academician N.V. Turbin.

УДК 547.96:543:51:543.54:543.4:576.3

Новая группа мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов: идентификация, физико-химические свойства и биологическое действие / В.Л. Ямскова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 14–23. – Соавт.: М.С. Краснов, Е.Ю. Рыбакова, В.В. Богданов, А.П. Ильина, О.Г. Куликова, Д.И. Мальцев, И.А. Ямсков

В данной работе рассмотрены эндогенные биорегуляторы, обнаруженные в различных тканях млекопитающих. Биорегуляторы имеют сложный состав и состоят из регуляторных пептидов и белков модуляторов. В растворах биорегуляторы представлены в виде крупных наноразмерных ассоциатов (50–300 нм). Была показана их локализация на поверхности клеток. В сверхмалых дозах (10^{-8} – 10^{-15} мг/мл) они участвуют в регуляции репаративных и восстановительных процессов в различных тканях. Их действие тканеспецифическое, но при этом отсутствует видовая специфичность. Среди множества молекулярных факторов, влияющих в низких концентрациях на различные биологические процессы, данные биорегуляторы можно выделить в отдельную группу на основании их оригинальных физико-химических свойств и специфической биологической активности. Данные биорегуляторы опосредуют прохождение регуляторного сигнала по межклеточному пространству тканей.

Ключевые слова: биорегуляторы, адгезия, ранозаживление.

A new group of membrane-acting tissue-specific homeostatic bioregulators: identification, physico-chemical properties and biological action / V. Yamskova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 14–23. – M. Krasnov, E. Rybakova, V. Bogdanov, A. Il'ina, O. Koulikova, D. Maltsev, I. Yamskov

In this article the endogenous bioregulators were found in various mammalian tissues. Bioregulators have a complex composition and consist of regulatory peptides and protein modulators. In solutions bioregulators presented as major associates nanoscale (50–300 nm). Their localization on the cell surface was shown. In ultra low doses (10^{-8} – 10^{-15} mg/ml), they are involved in the regulation of reparative and regenerative processes in different tissues. Their effect is tissue-specific, but there is no

species specificity. Among the many molecular factors that influence in low concentrations in the various biological processes, data bioregulators can be identified as a separate category on the basis of their original physical and chemical properties and the specific biological activity. These bioregulators mediate passage regulatory signal for intercellular space of tissues.

Key words: bioregulators, adhesion, wound healing.

УДК 575.174.015.3:598.2:591.69

Полиморфизм митохондриального гена *cox1* в популяции мариит трематод *Bilharziella polonica* (сем. *Schistosomatidae*), паразитирующих у водоплавающих птиц на озере Нарочь / Е.Э. Хейдорова, Г.Г. Хрисанфова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 24–35. – Соавт.: Е.И. Бычкова, С.К. Семенова, М.Е. Никифоров.

Статья посвящена молекулярно-генетическому анализу внутривидовой структуры шистосом *Bilharziella polonica*, паразитирующих у водоплавающих птиц на озере Нарочь, впервые проводимому на основе полиморфизма митохондриального гена *cox1*. Из 11 птиц, относящихся к 3 видам (кряква, хохлатая черныш и большая поганка), было выделено 36 мариит *B. polonica*, для последовательностей *cox1* которых характерно невысокое нуклеотидное разнообразие ($\pi = 0,4\%$). В выборке мариит выявлено 19 гаплотипов и средняя величина гаплотипического разнообразия достигает 52,78%.

Среди обнаруженных гаплотипов были выделены две четко дивергировавшие ($d = 0,004 \pm 0,001$) группы последовательностей – А и В. При этом отмечается низкий уровень аминокислотной дивергенции – 0,001. Разнообразие гаплотипов выше в линии А (12 гаплотипов), чем в линии В (7 гаплотипов). Представленность линии А среди мариит *B. polonica* составляет 69,44%, линии В – 30,56%. Гостальной специфичности в распределении гаплотипических линий обнаружено не было. Время образования двух линий гаплотипов *B. polonica* предположительно составляет 285–150 тыс. лет назад, что достаточно уверенно позволяет отнести его ко времени Днепровского, или Рисского, оледенения (250–135 тысяч лет назад) в позднем плейстоцене.

Ключевые слова: *cox1*, *Bilharziella polonica*, птицы, церкариоз, Нарочь.

Polymorphism of mitochondrial gene *cox1* in the population of maritas *Bilharziella polonica* (family *Schistosomatidae*) parasitizing in wildfowl of Lake Naroch / E. Kheidorova, G. Chrisanfova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 24–35. – E. Bychkova, S. Semenova, M. Nikiforov.

The article is devoted to detailed molecular-genetic analysis of intrapopulation structure of bird schistosomes *Bilharziella polonica* of Lake Naroch which first is carried out on basis of polymorphism of mitochondrial gene *cox1*. It was picked out 36 maritas *B. polonica* from 11 birds belonging to 3 species (the Mallard, the Tufted duck, the Great-crested grebe). Low nucleotide diversity ($\pi = 0,4\%$) is typical of their *cox1* sequences. 19 haplotypes is discovered in marita extracts and mean haplotypal diversity is 52,78%.

Two neatly diverged ($d=0,004 \pm 0,001$) groups of sequences (A and B lineages) is revealed among the haplotypes. However, level of aminoacid divergence is low (0,1%). Diversity of gaplotypes is higher in lineage A (12 gaplotypes) than in B (7 gaplotypes). Occurrence of line A among maritas *B. polonica* is 69,44%, line B – 30,56%. There is no host-specificity in distribution of haplotypal lines. Formation time of two lineages is likely 285–150 thousand years ago, in the Dnieper, or Riss, glaciations period (250–135 thousand years ago) in late pleistocene.

Key words: *cox1*, *Bilharziella polonica*, birds, cercariosis, Naroch.

УДК 631.524.86:633.11:632.3

Волуевич, Е.А. Генетические подходы в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине / Е.А. Волуевич // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 36–45.

Современные генетические подходы в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине предполагают создание сортов с разнородной генетической основой по генам устойчивости и разработку политики их территориального размещения. Для этого необходимо установление ареалов популяций патогена, сходных по факторам вирулентности, и наличие к ним эффективных генов устойчивости. В статье приводятся данные по мониторингу европейской популяции патогена, эффективности генов устойчивости и их комбинаций к этой популяции и генетические подходы для создания устойчивых сортов. Они включают использование генов простотковой и возрастной устойчивости, в том числе генов медленного развития болезни.

Ключевые слова: мягкая пшеница, листовая бурая ржавчина, гены устойчивости, генетические подходы в селекции.

Voluevich, E. Genetic approaches in common wheat breeding for resistance to brown rust / E. Voluevich // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 36–45.

The current genetic approaches in wheat breeding for leaf rust imply development of cultivars with diverse genetic basis for resistance genes and working out of their location policy. This requires determination of pathogen population areas similar in virulence factors and availability of effective resistance genes to them. The article presents the data on monitoring of the European pathogen population, the efficiency of resistance genes and their combinations for this population and genetic approaches to development of resistance cultivars. They include use of seedling and adult resistance genes, with genes of slow disease development.

Key words: bread wheat, leaf brown rust, resistance genes, genetic approaches in breeding.

УДК 631.524.86:633.11:632.3

Волуевич, Е.А. Генетические подходы в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к мучнистой росе / Е.А. Волуевич // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 46–55.

Возбудитель мучнистой росы пшеницы является патогеном высокого эволюционного риска, что обусловлено особенностями его биологии, включая наличие регулярного полового процесса. Генетические подходы в селекции на устойчивость к этой болезни должны предусматривать создание сортов, разнородных по генам устойчивости, и их территориальное размещение. Выбор главных генов устойчивости для использования в селекционных программах должен основываться на периодическом мониторинге популяций патогена по генам вирулентности. В статье приводятся результаты изучения эффективности генов устойчивости к мучнистой росе, в том числе и к белорусской популяции патогена. Рассматриваются генетические подходы для создания резистентных сортов, включая пирамидирование главных генов (как эффективных, так и преодолённых) и количественных локусов, ассоциированных с частичной устойчивостью, что позволяет продлить длительность устойчивости.

Ключевые слова: мягкая пшеница, мучнистая роса, гены устойчивости, генетические подходы в селекции.

Voluevich, E. Genetic approaches in common wheat breeding for resistance to powdery mildew / E. Voluevich // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 46–55.

The wheat powdery mildew pathogen is a pathogen of a high evolutionary risk due to peculiarities of its biology, including the presence of regular sexual process. The genetic approaches in breeding for resistance to this disease should provide development of cultivars diverse in resistance genes and their location. The choice of major resistance genes for use in breeding programs should be based on periodic monitoring of pathogen populations for virulence genes. The article presents the results of studying the efficiency of resistance genes to powdery mildew, including the Belarusian pathogen population. The genetic approaches for developing resistant cultivars, including pyramiding of major genes (both effective and defeated) and quantitative loci associated with partial resistance to extend the resistance duration.

Key words: bread wheat, powdery mildew, resistance genes, genetic approaches in breeding.

УДК 581.1+581.6+615.2

Кунах, В.А. Длительность жизни человека и биотехнология растений / В.А. Кунах, Л.П. Можилевская // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 56–62.

Изложены современные данные о длительности жизни человека, причинах смертности, рассмотрены факторы, определяющие длительность жизни и роль растительных препаратов в повышении показателя средней длительности жизни до уровня 110–115 лет. Проанализировано состояние природных источников растительного лекарственного сырья, показано, что единственным реальным источником экологически чистого растительного сырья является культура тканей. На примере результатов собственных исследований, выполненных в течение 1980–2012 гг., в обобщенном виде рассмотрены: причины, сдерживающие производство биологически активных веществ растительного происхождения в промышленных масштабах (в биореакторах); подходы, используемые для повышения уровня синтеза целевых продуктов и повышения производительности культивируемых клеток; задачи будущих исследований в области разработки промышленных биотехнологий лекарственных растений. Установлен ряд закономерностей биосинтеза вторичных метаболитов в культуре *in vitro*, используя которые создают биотехнологии путем получения адекватного генотипа (генофонда) клеточных популяций, способных к высокоэффективному синтезу целевых продуктов, и разработки условий для максимально полной реализации

этой способности. Рассмотрены основные этапы создания клеточных штаммов – продуцентов биологически активных веществ и технологий их выращивания.

Ключевые слова: длительность жизни человека, биотехнология лекарственных растений, получение вторичных метаболитов растений.

Kunakh, V. Human lifespan and plant biotechnology / V. Kunakh, L. Mozhylevskaya // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 56–62.

Current data on human lifespan and reasons underlying death rate have been presented and determinants of lifespan and role of plant preparations in increasing average lifespan to 110-115 years of age have been considered. State of natural plant raw material sources was examined to demonstrate that the only real environmentally friendly source may be a tissue culture. As exemplified by own results to be performed during 1980-2012 there were reviewed in most generalized aspect: causes counteracting production of biologically active compounds of plant origin in industrial scale (in bioreactors); approaches used to increase the level of target product synthesis and improving performance of cultured cells; tasks of future researches in the field of development of industrial technologies for medicinal plants. There were found series of regularities for biosynthesis of the secondary metabolites in culture *in vitro* whose using allows development of biotechnologies through generation of cell populations with adequate genotype (gene pool) capable to high-performance synthesis of target products and specifying conditions for maximally complete realization of this potential. Major steps in creating such cell strains and technologies for their maintenance were reviewed.

Key words: human lifespan, biotechnology of medicinal plants, production of plant secondary metabolites.

УДК 635.64:631.523:581.192.2

Корневые выделения генотипов томата (*Solanum lycopersicum* L.), отличающихся отзывчивостью на бактериализацию / А.И. Шапошников [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 63–68. – Соавт.: Т.С. Азарова, Л.В. Кравченко, А.А. Бажанова, Д.П. Бажанов, О.Г. Бабак, Н.А. Некрашевич, А.В. Кильчевский.

В результате оценки эффективности взаимодействия коллекционных линий и сортов томата с ризосферным рост-стимулирующим штаммом *Burkholderia* sp.418, были отобраны контрастные по отзывчивости на бактериализацию формы томата. Анализ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) выявил существенные различия позитивно отзывчивых и неотзывчивых форм томата по количеству и составу корневых выделений. Повышенное количество органических кислот, прежде всего молочной, наблюдалось в экссудатах у отзывчивых форм. В корневых выделениях наиболее отзывчивого сорта Зорка обнаружено высокое содержание фруктозы.

Ключевые слова: томат, корневые экссудаты, ризоферные бактерии, растительно-микробные ассоциации.

Root exudates of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes differing in responsiveness to bacterization / A. Shaposhnikov [et.al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 63–68. – Т. Azarova, L. Kravchenko, A. Bazhanova, D. Bazhanov, O. Babak, N. Nekrashevich, A. Kilchevsky.

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) forms contrasting for response to bacterization were selected as a result of the efficacy evaluation of the interaction between PGPR strain *Burkholderia* sp. 418 and tomato collection lines and cultivars. Analysis by HPLC has revealed substantial differences between the positively responsive tomato forms and non-responsive ones in the quantity and composition of root exudates. An increased amount of organic acids, in particular lactic acid, was observed in the exudates of the responsive forms. A high fructose content was found in root exudates of the most responsive cultivar Zorka.

Key words: tomato, root exudates, PGPR, plant-microbial associations.

УДК 575.174.015.3

Михайлова, М.Е. Полиморфизм генов соматропиновой оси (*pGH*, *pIGF-2*, *pIGF-1*, *pIGF-1R*) у свиньи домашней (*Sus Scrofa domestica*) / М.Е. Михайлова, Е.Л. Романишко // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 69–76.

Известно, что на ростовые процессы организма влияет комплекс эндокринных, аутокринных и паратипических факторов. Наиболее важную роль в этих процессах играет гормон роста. Регуляция синтеза гормона роста представляет собой многоуровневый каскад взаимодействий белок-рецепторов, тесно связанных

между собой. Изменение в работе любого из звеньев влечет за собой изменения в работе соматотропической оси, которые могут привести к различиям в фенотипических проявлениях количественных признаков продуктивности у сельскохозяйственных животных. В данной статье представлены результаты анализа генетического полиморфизма генов гормонального ряда соматотропической оси *pGH/MspI*, *pIGF-1/HhaI*, *pIGF-1R/SacII*, *pIGF-2/NciI* у свиньи домашней (*Sus Scrofa domesticus*).

Ключевые слова: полиморфизм, соматотропическая ось, полимеразная цепная реакция, ген, рецептор, свинья домашняя.

Mikhailova, M. Polymorphism genes somatotrophic axis (*pGH*, *pIGF-2*, *pIGF-1*, *pIGF-1R*) in the pig domestic (*Sus Scrofa domesticus*) / M. Mikhailova, H. Ramanishka // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 69–76.

It is known that on the growth processes of the body affect complex endocrine, autocrine and paratypic factors. The most important role in this process plays a growth hormone. The regulation of the synthesis of growth hormone is a multilevel cascade of interactions of protein receptor, which is closely linked. The change of the work of any of the links leads to a change in the somatotrophic axis, which may lead to differences in the phenotype of a quantitative productivity traits in farm animals. This article presents the results of analysis of the genetic polymorphism genes somatotrophic axis *pGH/MspI*, *pIGF-1/HhaI*, *pIGF-1R/SacII*, *pIGF-2/NciI* in the pig domestic (*Sus Scrofa domesticus*).

Key words: polymorphism, somatotrophic axis, polymerase chain reaction, gene, receptor, pig domestic.

УДК: [633.11+633.14]:631.524.86

Орловская, О.А. Оценка устойчивости к биотическим и абиотическим факторам гибридов озимой тритикале, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения / О.А. Орловская, Л.В. Хотылева // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14 – Минск, 2013. – С. 77–83.

Проведена оценка зимостойкости и устойчивости к наиболее распространенным грибным патогенам 24 гибридов F₁ озимой тритикале, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения. Установлено, что у 12 из 24 гибридных образцов процент перезимовки превышал стандарт – сорт тритикале Михась. Выявлены генотипы с высокой устойчивостью к мучнистой росе (83,3%), бурой ржавчине (87,5%) и септориозу (25%). Резистентность одновременно к двум заболеваниям проявило 50% изученных гибридов, к трем – 16,7%. По изученным показателям выделялись комбинации, созданные на основе образца 42м из коллекции СИММУТ. Полученные данные свидетельствуют о перспективности вовлечения в гибридизацию образцов из мирового генофонда для создания ценного исходного материала тритикале с повышенной устойчивостью к воздействиям биотических и абиотических стрессов.

Ключевые слова: тритикале, зимостойкость, устойчивость к грибным патогенам.

Orlovskaya, O. Estimation of winter triticale hybrid resistance to biotic and abiotic factors developed by crossing accessions of different ecological-geographic origin / O. Orlovskaya, L. Khotyleva // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 77–83.

Winter hardiness and resistance to fungal pathogens was estimated in 24 winter triticale F₁ hybrids, developed by crossing accessions of different ecological-geographic origin. Percentage of overwintering exceeded the standard (triticale Michas) in 12 of 24 hybrid accessions. Genotypes with high resistance to powdery mildew (83,3%), leaf rust (87,5%) and septoria (25%) were identified. 50% of the studied hybrids showed resistance to two diseases, 16,7% – to three. Combinations that are based on an accession of 42m from the CIMMYT collection were the best.

The data obtained show the outlook of involving accessions from the world gene pool in the hybridization for developing valuable initial triticale material with increased resistance to biotic and abiotic stresses.

Key words: triticale, winter hardiness, resistance to fungal pathogens.

УДК [57:61+575]:004

Дромашко, С.Е. Развитие математической генетики и биоинформатики в Беларуси / С.Е. Дромашко // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 84–94.

В статье анализируются работы по математической биологии и биоинформатике, выполненные учеными Беларуси, в первую очередь исследования Института генетики и цитологии НАН Беларуси по биометрической генетике, компьютерной видеомикроскопии и созданию информационных ресурсов и компьютерных программ.

Ключевые слова: биоинформатика, биометрическая генетика, компьютерная биометрия, компьютерная видеомикроскопия, медицинская информатика, пакеты прикладных генетико-статистических программ, распознавание образов, теоретико-информационный подход.

Dromashko, S. Development of mathematical genetics and bioinformatics in Belarus / S. Dromashko // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 84–94.

The article deals with an analysis of the works in mathematical biology and bioinformatics, made by Belarus scientists, primarily investigations of the Institute of Genetics and Cytology of the NAS of Belarus on biometric genetics, computer videomicroscopy and development of information resources and computer programs.

Key words: applied genetic-statistical program packages, bioinformatics, biometrical genetics, computer biometry, computer videomicroscopy, information theory approach, medical informatics, pattern recognition.

УДК 573.6:579.64.071

Бажанов, Д.П. Конъюгационный перенос генов деградации симазина *Herbaspirillum huttiense* B601 в родственные бактерии / Д.П. Бажанов, К.К. Яцевич // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 95–100.

Установлено, что способность использовать симазин в качестве единственного источника азота передается при конъюгации из бактерии *H. huttiense* B601 в типовой штамм вида *H. huttiense* DSM 10281^T с частотой около 10⁻⁶ на клетку реципиента. Не удалось обнаружить передачи способности катаболизировать симазин из *H. huttiense* B601 в бактерии, принадлежащие к родственным видам *H. frisingense* и *H. seropedicae*. Способность к утилизации симазина передавалась в *H. huttiense* DSM 10281^T не вследствие самостоятельного переноса крупной Smz плазмиды донора, а за счет мобилизации расположенных на ней генов деградации *smzA*, *-B* и *-C* второй резидентной плазмидой.

Ключевые слова: *Herbaspirillum*, симазин, биodeградация, конъюгация, *smz* гены.

Bazhanov, D. Conjugational transfer of the *Herbaspirillum huttiense* B601 genes for simazine degradation to related bacteria / D. Bazhanov, K. Yatsevich // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 95–100.

The capability to utilize simazine as sole nitrogen source was found to be transferred by conjugation from *H. huttiense* B601 to the type strain of the species *H. huttiense* DSM 10281^T with the frequency of 10⁻⁶ per cell of recipient. No transfer of the capability to catabolize simazine was observed from *H. huttiense* B601 to the bacteria, belonging to the related species *H. frisingense* and *H. seropedicae*. The capability to utilize simazine was transferred to the *H. huttiense* DSM 10281^T not due to the self-transmission of the large Smz plasmid of the donor, but through mobilization of the located on it degradation genes *smzA*, *-B* and *-C* by the other resident plasmid.

Key words: *Herbaspirillum*, simazine, biodegradation, conjugation, *smz* genes.

УДК 577.21:796

Анализ молекулярно-генетических маркеров, ответственных за устойчивость к физическим нагрузкам, у представителей академической гребли / Л.А. Кундас [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 101–105. – Соавт.: К.В. Жур, Н.И. Бышнев, Т.Н. Прохорова, Е.А. Лосицкий, П.Н. Малашевич, И.Б. Моссэ.

С целью выявления наиболее информативных генетических маркеров, определяющих выраженность и стойкость адаптационных реакций к интенсивным физическим нагрузкам, проведено исследование образцов ДНК членов Национальной команды Беларуси по академической гребле. Выполнен молекулярно-генетический анализ полиморфизмов 7 генов: *ACE (I/D)*, *VEGF (G634C)*, *MB (A79G)*, *PPARG (Pro12Ala)*, *BDKRB2 (I/D)*, *HIF1A (C1772T)*, *UCP2 (Ala55Val)*.

Показана существенно более высокая частота генотипов *A/A MB* ($OR = 5,45$; $p < 0,05$), *Ala/Ala PPARG* ($OR = 6,38$; $p < 0,05$), а также аллеля Т гена *HIF1A* ($OR = 3,13$; $p < 0,05$) и аллеля D гена *BDKRB2* ($OR = 2,02$; $p < 0,05$) в группе гребцов-академистов по сравнению с контрольной группой. Кроме того, отмечалась отчетливая тенденция к преобладанию генотипов *C/C* гена *VEGF* ($OR = 2,48$) и *Val/Val* ($OR = 2,20$) гена *UCP2* в группе исследованных спортсменов. В то же время, различий в частотах аллельных вариантов гена *ACE* в генотипах протестированных групп обнаружено не было.

Полученные нами данные позволяют включить полиморфизмы генов *MB*, *PPARG*, *HIF1A*, *BDKRB2* в диагностический комплекс для отбора перспективных гребцов-академистов.

Ключевые слова: ПЦР-анализ, ДНК-полиморфизмы, спортивный отбор, аэробные и анаэробные нагрузки.

Analysis of genetic markers for resistance to a physical stress in elite collegiate rowers / L. Kundas [et. al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 101–105. – К. Zhur, N. Byshnev, T. Prohorova, Y. Lasitski, P. Malashevich, I. Mosse.

The aim of this study was to identify the most informative genetic markers of resistance to intensive physical stress. Genotypes of the Belarus National team members for rowing were analysed. Genetic analysis of *ACE (I/D)*, *VEGF (G634C)*, *MB (A79G)*, *PPARG (Pro12Ala)*, *BDKRB2 (I/D)*, *HIF1A (C1772T)*, *UCP2 (Ala55Val)* gene polymorphisms was performed.

Frequencies of *MB A/A* ($OR = 5.45$; $p < 0.05$), *PPARG Ala/Ala* ($OR = 6.38$; $p < 0.05$) genotypes, *HIF1A* gene *T* allele ($OR = 3.13$; $p < 0.05$) and *BDKRB2* gene *D* allele ($OR = 2.02$; $p < 0.05$) were significantly higher in rowers compared to controls. Besides there was a tendency to the prevalence of *VEGF* gene *C/C* genotype ($OR = 2.48$) and *UCP2* gene *Val/Val* genotype ($OR = 2.20$) for athletes. There was no difference in *ACE I/D* genotypes or alleles frequencies distribution between analyzed groups.

Screening of *MB*, *PPARG*, *HIF1A*, *BDKRB2* gene polymorphisms can be used in the diagnostic system for the purposes of young rowers' selection.

Key words: PCR analysis, DNA polymorphisms, athlete selection, aerobic and anaerobic exercise.

УДК 575.224.46:577.2.08: 616.62.006.6

Особенности дестабилизации генома лимфоцитов периферической крови при раке мочевого пузыря / Н.В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 106–112. – Соавт.: Т.Д. Кужир, А.И. Ролевич, С.Л. Поляков, С.А. Красный, Р.И. Гончарова.

С помощью метода ДНК-комет проанализирована целостность и стабильность генома лимфоцитов, выделенных из образцов крови от пациентов с подтвержденным диагнозом «рак мочевого пузыря» (РМП), здоровых доноров, пожилых людей и лиц с хроническими воспалительными заболеваниями. Оценены уровни эндогенных и H_2O_2 -индуцированных повреждений ДНК, кинетика и эффективность репарации ДНК за 3-часовой период инкубации обработанных лимфоцитов. У пациентов с РМП средний уровень индуцированных повреждений ДНК сразу после мутагенной обработки *in vitro*, был существенно повышен по сравнению с контролем и другими группами без онкопатологии. Частота индивидумов с повышенной чувствительностью лимфоцитов к окислительному стрессу, оказалась также выше среди пациентов с РМП, что вместе с предыдущими данными указывает на ассоциацию некоторых признаков геномной нестабильности с канцерогенезом, что обусловлено нарушениями редокс-гомеостаза в клетках крови человека.

Ключевые слова: повреждения ДНК, репарация ДНК, лимфоциты, метод ДНК-комет, рак мочевого пузыря.

The features of genome destabilization in peripheral blood lymphocytes in bladder cancer / N. Savina [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 106–112. – Т. Kuzhir, A. Rolevich, S. Polyakov, S. Krasnyi, R. Goncharova.

Using the comet assay, the genome integrity and stability were analyzed in lymphocytes collected from patients with verified diagnosis of bladder cancer (BC), healthy donors, elderly persons and subjects with chronic inflammatory diseases. The levels of endogenous DNA damage, H_2O_2 -induced DNA damage, kinetics and efficiency of DNA repair for 3-h period of exposed lymphocyte incubation were estimated. In BC patients, the average levels of DNA damage induced immediately after mutagenic treatment of lymphocytes *in vitro* was significantly increased as compared to control and other non-cancer groups. The proportion of individuals with increased lymphocyte sensitivity to oxidative stress was also higher among BC patients. Along with the previous data this finding indicated the association of some features of genome instability with carcinogenesis due to disturbances in redox homeostasis in human blood cells.

Key words: DNA damage, DNA repair, lymphocytes, Comet-assay, bladder cancer.

УДК 631.524.86:633.111:632.4

Теломерная концепция старения и онкогенеза для медицины / О.В. Квитко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 113–120. – Соавт.: А.С. Сапун, Н.А. Балашенко, Я.И. Шейко, И.И. Конева, С.Е. Дромашко.

Открытие предсказанного А.М. Оловниковым процесса маргинотомии (сокращения концевых участков ДНК хромосом во время клеточного деления) явилось началом нового направления молекулярной генетики. Эта область исследований, успехи которой отмечены Нобелевской премией 2009 года, приобретает все большую практическую значимость для медицины. Сокращение теломер является одним из важнейших механизмов клеточного старения, приводящего к ряду заболеваний, включая такую распространенную болезнь как атеросклероз. С другой стороны, аномальная активизация фермента теломеразы или альтернативных процессов восстановления теломерных участков наблюдается при канцерогенезе. Определение активности теломеразы является тестом в онкодиагностике, а ингибирование теломеразы используется в онкотерапии. В то же время, регулируемое повышение активности теломеразы является перспективным подходом к омоложению клеток с целью противодействия старению и сопутствующим заболеваниям.

Ключевые слова: теломеры, теломерные повторы, теломераза, маргинотомия, клеточное старение, онкодиагностика, атеросклероз, диабет.

Telomere concept of aging and oncogenesis for medicine / O. Kvitko [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 113–120. – A. Sapun, N. Balashenko, I. Koneva, Y. Sheiko, S. Dromashko.

The discovery of the process of marginotomy (shortening of DNA regions at the ends of chromosomes during cell division) predicted by A.M. Olovnikov has become a start of the new field of molecular genetics. This area of research, which was awarded the Nobel Prize in 2009, gains an increasing practical significance for medicine. Telomere shortening is one of the major mechanisms of cellular aging, which leads to a number of illnesses, including such a common diseases as atherosclerosis. On the other hand, the abnormal activation of the enzyme telomerase or alternative processes of the recovery of telomeric regions occur during carcinogenesis. Determination of telomerase activity is a test in oncological diagnostics, and inhibition of telomerase is used in cancer therapy. At the same time, the regulated increase of telomerase activity is a promising approach to the rejuvenation of cells aimed at the slowing of aging and prevention of age-related diseases.

Key words: telomere, telomeric repeats, telomerase, marginotomy, cellular aging, oncodiagnosics, atherosclerosis, diabetes.

УДК 631.526:635.11

Федорова, М.И. Особенности размножения инбредных потомств свеклы столовой при селекции на гетерозис / М.И. Федорова, С.А. Ветрова, Е.Г. Козарь // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. – С. 121–129.

На основе сортовых и гибридных популяций свеклы столовой получены инбредные линии с различной степенью проявления цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), маркерным признаком которой является характерная окраска пыльников. По степени окрашивания выделено четыре группы стерильных пыльников, различных по диаметру, числу и диаметру пыльцевых зерен. Фенотипические проявления признака ЦМС семенных растений отличаются и определяют степень стерильности растения (Cms). Высокая вариабельность семенной продуктивности инбредных растений обусловлена степенью проявления ЦМС, системой самонесовместимости, наличием самофертильных и самостерильных генотипов, условиями и технологией выращивания. Использование культуры штеклингов позволяет не только ускорить селекционный процесс, но и увеличить выход генетически разнообразного инбредного материала.

Ключевые слова: свекла, инбридинг, потомство, стерильность, линия.

Fedorova, M. Features of reproduction of inbred progeny of red beet for heterosis breeding / M. Fedorova, S. Vetrova, E. Kozar // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 121–129.

Based on cultivar and hybrid populations, the red beet inbred lines with different intensity of appearance of cytoplasmic male sterility (CMS) were developed. The marker for trait of male sterility is anther color. Four groups of anther were developed based on color grade, diameters, amount and diameters of pollen grains. The rate of appearance of cytoplasmic male sterility (CMS) trait is varied. The high variability of seed production of inbred lines depends on the following factors: rate of intensity of appearance of CMS, system of self-incompatibility, presence of self-fertile and self-sterile biotypes, condition and technology of growing. Utilization of steckling culture allows to speed up the breeding process and increase the yield of genetically diverse inbred material.

Key words: beetroot, inbreeding, progeny, cytoplasmic sterility, line.

УДК [631.523+633.1](001.9+091)

Стельмах, А.Ф. Идеи Н.В. Турбина для развития генетических работ Селекционно-генетического института / А.Ф. Стельмах // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 14. – Минск, 2013. –С. 130–134.

При переводе автора на работу в ВСГИ (1968 г.) Н.В. Турбин высказал две рекомендации: развернуть исследования по анеуплоидии пшениц и перевести исследования по «переделкам наследственности и инъекциям растительных гомогенатов» на методически безукоризненную основу. Именно эти рекомендации существенно повлияли на дальнейшее развитие генетических работ в институте. Помимо выявления механизмов «изменчивости при переделках и инъекциях», они стимулировали широкое изучение генетики типа и скорости развития пшениц, явились поводом для развертывания работ по культуре клеток *in vitro*, по направлению генетики биохимических признаков (запасных белков) и даже в какой-то мере по молекулярной генетике.

Ключевые слова: идеи Н.В. Турбина, генетические исследования, современное состояние.

Stelmakh, A. N.V. Turbin's ideas for the evolution of genetic investigations in Plant Breeding and Genetics Institute / A. Stelmakh // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 130–134.

When the author was invited to work in PB&GI (1968) N.V. Turbin gave two recommendations: to develop investigation on wheat aneuploidy and to transfer the studies on “autumnization and plant homogenate injection” into irreproachable methodology. Just those recommendations affected significantly further genetic programmes at the institute. In addition to elucidation the mechanisms of genetic variability at “autumnization and injection” they stimulated intensive studies on growth habit and rate of development genetics, on tissue culture *in vitro*, on the direction of biochemical genetics (genetics of storage protein biosynthesis) and even on molecular genetics in some measure.

Key words: N.V. Turbin's advices, genetic research, actual state.

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 14

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*
Переводчик *О.А. Лазаренко*
Верстка *Е.А. Клевец*
Корректор *И.В. Широкая*
Технический редактор *Е.А. Клевец*

Подписано в печать 28.02.2013. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 16,97. Уч.изд. л. 11,46. Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в типографии ООО «Поликрафт»

ЛП № 02330/0494199 от 03.04.2009

220103, г. Минск, ул. Кнорина, 50, корп. 4

Оригинал-макет подготовлен ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»