

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 15**

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. 15. – 120 с. – ISSN 1999-9127.

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

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

Редакционная коллегия:

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

УДК [577.21 + 575] (082)

ISSN 1999-9127

ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси», 2013

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский, И.Б. Моссэ</i> Жизненный и творческий путь академика Петра Фомича Рокицкого.....	7
<i>Е.А. Волуевич, Н.В. Павлючук</i> Генетические подходы в селекции картофеля на устойчивость к вирусам	16
<i>П.В. Кузмицкая, О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская</i> Идентификация вируса хлоротической пятнистости листьев яблони методом ОТ-ПЦР....	26
<i>Н.В. Савина</i> Изучение аллельного полиморфизма гена <i>TNF-α</i> при раке мочевого пузыря	33
<i>А.П. Ермишин</i> Мейотическое удвоение хромосом в селекции картофеля с использованием отбора на диплоидном уровне	39
<i>О.А. Орловская, Л.В. Хотылева</i> Анализ связи между гетерозисом и трансгрессивной изменчивостью по признакам продуктивности у гибридов ярового тритикале	48
<i>Е.В. Антоненко, В.А. Лемеш, Е.М. Кременевская, Н.М. Ермишина, О.И. Зайцева</i> Сравнительный анализ полиморфизма локусов хромосомы 5A у пшеницы и тритикале с использованием SSR-маркеров.....	54
<i>Н.Б. Белько, И.С. Гордей, И.А. Гордей, Э.П. Урбан</i> Дупликация генома озимой ржи (<i>Secale cereale</i> L.) с использованием закиси азота (N ₂ O).....	64
<i>В.А. Лемеш, М.В. Богданова, Е.В. Гузенко, З.Е. Грушецкая, В.И. Сакович, Т.Е. Саматадзе, О.А. Рачинская, О.В. Муравенко</i> Генетический полиморфизм сортов льна (<i>Linum usitatissimum</i> L.) в зависимости от периода селекции.....	75
<i>А.Л. Гончар, И.Б. Моссэ</i> Роль генетических факторов в развитии инфаркта миокарда (гендерные и возрастные аспекты) ...	87
<i>Д.П. Бажанов, К.К. Яцевич, Л.И. Прищепя, Д.В. Войтка</i> Молекулярное типирование энтомопатогенных бактерий, изолированных на территории Беларуси.....	96

Е.В. Воронкова, Ю.В. Полюхович, А.В. Савчук, О.Н. Гукасян, А.П. Ермишин
Полевая устойчивость к фитофторозу гибридов, полученных путем опыления вида-
посредника *Solanum verrucosum* и SvSv-линий на его основе диплоидными 1 EBN
видами картофеля 104

Рефераты..... 111

Правила оформления статьи..... 118

CONTENTS

<i>L. Khotyleva, A. Kilcheusky, I. Mosse</i> The life path and creative way of academician Petr Fomich Rokitski	7
<i>E. Voluevich, N. Pavlyuchuk</i> Genetic approaches to potato breeding virus resistance	16
<i>P. Kuzmitskaya, O. Urbanovich, Z. Kozlovskaya</i> RT-PCR identification of Apple chlorotic leaf spot virus	26
<i>N. Savina</i> The study of the gene <i>TNF-α</i> polymorphism in the bladder cancer	33
<i>A. Yermishin</i> Meiotic chromosome doubling in potato breeding with the use of selection at the diploid level	39
<i>O. Orlovskaya, L. Khotyleva</i> Analysis of the relationship between heterosis and transgressive variation for productivity in spring triticale hybrids	48
<i>E. Antonenko, V. Lemesh, E. Kremenevskaja, N. Yermishina, O. Zaitseva</i> The comparative analysis of polymorphism of triticale and wheat chromosome 5 loci using SSR-markers	54
<i>N. Belko, I.S. Gordei, I.A. Gordei, E. Urban</i> Genome duplication of winter rye (<i>Secale cereale</i> L.) using nitrous oxide (N ₂ O).....	64
<i>V. Lemesh, M. Bogdanova, Ye. Guzenko, Z. Grushetskaya, V. Sakovich, T. Samatadze, O. Rachinskaya, O. Muravenko</i> Genetic polymorphism of flax varieties (<i>Linum usitatissimum</i> L.) depending on selection period	75
<i>A. Gonchar, I. Mosse</i> Role of genetic risk factors in myocardial infarction development (sex and age aspects).....	87
<i>D. Bazhanov, K. Yatsevich, L. Pryshepa, D. Voytka</i> Molecular typing of entomopathogenic bacteria isolated in Belarus	96

E. Voronkova, Yu. Polyukhovich, A. Savchuk, O. Gukasyan, A. Yermishin
Field late blight resistance of hybrids resulted from pollination of bridge species *Solanum verrucosum* and SvSv-lines on its basis by diploid 1 EBN potato species..... 104

Summaries 111

Instructions to authors 118

Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский, И.Б. Моссэ

ЖИЗНЕННЫЙ И ТВОРЧЕСКИЙ ПУТЬ АКАДЕМИКА ПЕТРА ФОМИЧА РОКИЦКОГО (обзорная статья)

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

15 августа 2013 г. исполнилось 110 лет со дня рождения выдающегося сына белорусского народа академика АН Беларуси, лауреата Государственной премии, заслуженного деятеля науки, первого президента Белорусского общества генетиков и селекционеров Петра Фомича Рокицкого. Академик П.Ф. Рокицкий принадлежит к плеяде выдающихся ученых страны. Он внес существенный вклад в становление и дальнейшее развитие общей и теоретической генетики, радиационной генетики, теории мутагенеза, теории отбора, теоретических основ селекционного процесса, биологической статистики. Широко известны его работы по вопросам философии, истории биологии и генетики в Советском Союзе.

Научная биография академика П.Ф. Рокицкого отражает важнейшие события в истории нашей страны.

Петр Фомич родился в 1903 г. 15 августа (2 августа по старому стилю) в деревне Кустовница бывшей Минской губернии Мозырского района в семье служащего. (Деревня не сохранилась, она находилась в 14 км от современного пос. Криничный Гомельской обл. Республики Беларусь)

Его дед по материнской линии, Валериан Вислоух, служил у помещиков на винокуренных заводах, так как был большим специалистом. Бабушка была учительницей. Осложнение после болезни лишило ее слуха, и она вынуждена была оставить свою работу и переключиться на сельское хозяйство. Следует отметить, что это была интеллигентная, добропорядочная семья.

Отец, Фома Петрович Рокицкий, белорус польского происхождения, из дворян, был управляющим имением Михновичи Мозырского прихода. Мать, Павлина Валериановна, урожденная Вислоух. У матери Петра было четыре брата и три сестры, все внешне удивитель-

но красивые. Старший брат Олесь (Александр) окончил медицинский институт в Москве, и его, как очень одаренного, оставили в Москве работать. Периодически наведывая родных в д. Кустовнице, он без гонорара лечил своих земляков. Антон был дипломированным землеустроителем, Владислав – агрономом, Иосиф закончил юридический факультет. Все братья получили дипломы с отличием.

В детские годы Петру Рокицкому приходилось бывать в разных местах, так как отец часто менял место работы: Двинск (Даугавпилс), Чериков, Могилев. С 1913 по 1915 годы он учился в Мозырской гимназии. Все отмечали незаурядные способности Петра. За особую успеваемость он был освобожден от платы за обучение в гимназии, что являлось немаловажным фактом для его небогатых родителей.

В 1915 г., в связи с переездом семьи, Петр Фомич был переведен в Чериковскую гимназию. После революции она была переименована в школу второй ступени. Тогда же он познакомился с семьей известных революционеров Лепешинских, общение с которыми оставило неизгладимый след в его душе.

Лепешинские переехали в Чериков в начале 1918 г. В 1919 г. Пантелеймон Николаевич организовал в заброшенном имении Лемень школу-коммуну. Его брат Модест Николаевич заведовал школой, а сестра Зинаида Николаевна преподавала в ней словесность.

Позднее, уже будучи академиком, Петр Фомич, вспоминая о леменском периоде своей жизни, выделил главные стороны педагогической системы Лепешинского: ученики самостоятельно вели хозяйство, готовили, стирали, плотничали и столярничали, организовывали музыкальные вечера, сами принимали важнейшие решения, касающиеся их жизни, учебы, быта. Естественно, что Лепешинские направляли деятельность школы, но делали это

тактично и умело. Рокицкий вместе со всеми принял деятельное участие в организации школы-коммуны. «Работать приходилось много и в классах, и в поле. Работали увлеченно, с жаром, с любовью», – вспоминал Петр Фомич.

М.Н. Лепешинский обратил внимание на педагогические способности Петра и предложил ему, 17-летнему выпускнику, остаться там учителем. Молодой человек с удовольствием принял это предложение и на протяжении 2-х лет преподавал в школе свой любимый предмет – биологию. Он писал: «Меня не огорчало, что студентом я стал на 2 года позже. Зато основательно себя подготовил. Не без пользы оказалось мое близкое общение с чудесным человеком в лице тов. Лепешинского». Из автобиографии: «В 1921 г. окончил леменскую опорно-показательную школу-коммуну второй ступени и оставлен в ней преподавателем физики и естествознания».

Увлечение молодого педагога биологией, начавшееся в этот период, определило его дальнейшую судьбу, стало главным делом жизни.

В 1923 г. П.Ф. Рокицкий поступил в Первый Московский государственный университет на

биологическое отделение по циклу «экспериментальная зоология» по специальности «генетика». Петр Фомич занимался на кафедре, которой руководил Н.К. Кольцов. С 1925 г., будучи еще студентом, Петр Фомич начал работать под руководством С.С. Четверикова в лаборатории генетики Института экспериментальной биологии, директором которого был Н.К. Кольцов. В 1926–1927 гг. Петр Фомич принимал участие в большой коллективной работе лаборатории по изучению природных популяций дрозофилы. Этими исследованиями было доказано, что естественные популяции, как губки, по выражению Четверикова, насыщены мутациями. С работ С.С. Четверикова и началось развитие в стране популяционной генетики. Научной работой П.Ф. Рокицкого руководили выдающиеся генетики С.С. Четвериков и А.С. Серебровский. Новаторские молекулярно-генетические и популяционно-генетические идеи и подходы основателей советской генетической школы Н.К. Кольцова, С.С. Четверикова, А.С. Серебровского и предопределили широту научных интересов академика П.Ф. Рокицкого.



Рис. 1. Группа учеников Н.К. Кольцова. Слева направо: Е.И. Балкашина, Н.К. Беляев, П.Ф. Рокицкий, С.М. Гершензон, Б.Л. Астауров, 1928 г.

В 1927 году он окончил МГУ, защитив дипломную работу на тему «Генетический анализ числа грудных щетинок у *Drosophila melanogaster*», выполненную под руководством проф. Н.К. Кольцова и доц. А.С. Серебровского.

В книге В.М. Польшина «Пророк в своем отечестве» о выдающемся советском биологе Николае Константиновиче Кольцове, есть

фотография великого ученого со своими учениками и сотрудниками Института экспериментальной биологии в Москве, подписанная «Птенцы гнезда» Н.К. Кольцова (рис. 1). Фото датировано 1927 или 1928 годом (так сказано в подписи под фотографией), на ней в заднем ряду стоит будущий академик АН БССР П.Ф. Рокицкий. Всего на фотографии

около 20 человек во главе с Н.К. Кольцовым. Но какие «птенцы»! Среди них: впоследствии академик АН СССР, выдающийся специалист по биологии развития Б.Л. Астауров; крупный генетик, работавший в Сибири, академик АН СССР Н.К. Беляев; известный генетик, академик АН Украины С.М. Гершензон; крупный гидробиолог, член-корр. АН СССР Г.Г. Винберг, работавший в БГУ и в последние годы своей жизни – в Зоологическом институте АН СССР в Ленинграде; основатель экологической физиологии водных животных проф. МГУ С.Н. Скадовский; известный гидробиолог А.П. Щербаков, орнитолог А.Н. Промтов и другие. Они вошли в науку в свои молодые годы в замечательном центре экспериментальной биологии Н.К. Кольцова.

После окончания МГУ Петр Фомич поступил в аспирантуру и занялся исследованием действия генов в онтогенезе и влияния повышенной температуры на появление мутаций. После окончания аспирантуры Петр Фомич совмещал преподавание генетики в МГУ с работой старшего научного сотрудника, а затем ученого специалиста и руководителя бригады по теоретическим вопросам селекции сельскохозяйственных животных Всесоюзного института животноводства. В течение 8 лет он проводил экспериментальное изучение эффективности искусственного отбора при естественной и вызванной рентгеновскими лучами изменчивости. В 1935 г. Петр Фомич был утвержден квалификационной комиссией ВАСХНИЛ в ученое звание действительного члена Института и в степени кандидата биологических наук (без защиты диссертации). Работа по эффективности отбора явилась основой докторской диссертации Петра Фомича, которую он успешно защитил в 1939 г. в Московском Университете, и в 1940 г. был утвержден в степени доктора биологических наук и получил звание профессора.

В 1932 году П.Ф. Рокицкий написал первый в СССР учебник по генетике для зоотехнических вузов, который выдержал 4 издания и был переведен на украинский, латышский и эстонский языки, а также выпустил книги «Дрозофила. Руководство для практических занятий» (1932), «Практическое пособие по генетике» (1934) и «Явления наследственности» (1937).

Дар П.Ф. Рокицкого как популяризатора науки отмечал еще Н.К. Кольцов.

С 1938 г. П.Ф. Рокицкий стал заведовать кафедрой генетики и разведения сельскохозяйственных животных в Московском Пушно-Меховом Институте, где проработал до 1948 г. Наряду с педагогической вел там и научную работу (вопросы генетики пушных зверей, отбора, наследуемости, применения математических методов). С 1938 по 1947 гг. был деканом зоотехнического (каракулеводческого) факультета. Во время Великой отечественной войны Московский пушно-меховой институт был отправлен в эвакуацию в г. Самарканд, где П.Ф. Рокицкий до 1948 г. исполнял обязанности зам. директора Самаркандского отделения Института.

В 1945 г. П.Ф. Рокицкий Указом Президиума Верховного Совета СССР был награжден орденом «Знак почета», в 1946 г. – медалью «За доблестный труд в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.». В 1948 г. награжден медалью «В ознаменование 800-летия Москвы».

Печально известную сессию ВАСХНИЛ 1948 года профессор П.Ф. Рокицкий воспринял как трагическую ошибку и, будучи проректором Московского Пушно-Мехового Института, открыто заявил о своем несогласии с ее решениями, направленными на административный разгром генетики, ликвидацию генетических кафедр и лабораторий. Такая принципиальная позиция в тех условиях вела к вполне предсказуемому результату – изгнанию из института. Зарабатывать на жизнь пришлось преподаванием математики в вечерней школе рабочей молодежи в г. Балашиха.

В конце 1949 г. П.Ф. Рокицкий был приглашен в Коми филиал Академии наук СССР (г. Сыктывкар) и посвятил восемь лет своей жизни (с 25 октября 1949 г. по 25 августа 1957 г.) исследованиям по животноводству Коми АССР, став основателем радиоэкологии в Коми научном центре АН СССР.

История Коми филиала Академии наук СССР началась в сентябре 1941 г. – путем слияния Кольской и Северной баз АН СССР, эвакуированных в Сыктывкар, образовалась база Академии наук СССР по изучению Севера. После реэвакуации Кольской и Северной баз 1 июня советское правительство учредило в Сыктывкаре базу АН СССР в Коми

АССР. Руководствуясь общим планом научно-исследовательских работ АН СССР, коллектив ученых развернул систематическое изучение природных ресурсов республики, истории и языка народа коми. Сыктывкар тогда был весьма невелик, был связан с внешним миром грунтовыми дорогами и водным путем, и лишь с 1946 г. была установлена регулярная авиасвязь с Москвой.

В конце 1949 г. научно-исследовательская база Академии наук СССР была преобразована в Коми филиал АН СССР. Он состоял из нескольких отделов и секторов, в которых работали 59 научных сотрудников, 37 из которых имели ученые степени.

С 25 октября 1949 г. Петр Фомич Рокицкий был зачислен на работу в качестве старшего научного сотрудника по животноводству сектора сельскохозяйственной биологии и экономики Коми Филиала АН СССР, а затем утвержден Советом филиалов АН СССР в должности старшего научного сотрудника Коми филиала АН СССР.

С 12 января 1954 г. Петр Фомич Рокицкий был переведен на должность исполняющего обязанности заведующего отделом животноводства и зоологии филиала и со 2 апреля 1954 г. возглавил отдел животноводства и зоологии филиала в качестве заведующего.

Во время работы в Республике Коми Петр Фомич вел значительную общественную работу, был Членом правления Коми отделения «Общества по распространению научных знаний», а с марта 1955 года был избран Председателем Коми республиканского комитета защиты мира. Он являлся членом президиума филиала, членом Президиума Коми отделения общества по распространению политических и научных знаний. За время работы в Коми филиале им были организованы научные исследования по животноводству: по жирномолочности, породистости и продуктивности скота, кормовой базе животноводства в Коми Республике. Петр Фомич принимал активное участие в издательской работе филиала и лично участвовал в освещении в местной и центральной печати вопросов животноводства Коми АССР.

7 марта 1957 г. впервые в стенах Коми филиала Академии наук П.Ф. Рокицкий, вдохновленный на совещании биологов в Москве

поднятой проблемой переориентации сил в радиобиологических исследованиях, призвал ученых к созданию здесь нового научного направления – радиобиологии.

В инициативный центр радиобиологической группы Коми филиала АН СССР вошли: заведующий отдела животноводства и зоологии П.Ф. Рокицкий, председатель президиума Коми филиала АН СССР П.П. Вавилов, м.н.с. отдела животноводства и зоологии В.И. Маслов. 10 июля была отправлена первая экспедиция в район г. Ухта для изучения повышенной радиоактивности в регионе.

21 сентября 1959 г. радиобиологическая группа принимает статус лаборатории радиобиологии (научный руководитель – П.П. Вавилов, и.о. зав. лаб. – В.И. Маслов). Основная тема, разрабатываемая сотрудниками лаборатории радиобиологии – «Влияние малых доз ионизирующих излучений на живые организмы в районах повышенного фона радиации». Так, с легкой подачи Петра Фомича Рокицкого в Коми филиале АН СССР зародилось новое научное направление – радиоэкология, которое и в настоящее время успешно развивается в Институте биологии Коми НЦ УрО РАН.

Политическая ситуация в стране менялась, и в 1957 г. П.Ф. Рокицкий получил возможность переехать в Москву для работы во Всесоюзном Институте Научной Информации (ВИНИТИ) в качестве зам. главного редактора РЖ «Биология» и зав. отделом общей биологии этого журнала. Однако Петра Фомича тянуло в родную Беларусь. В 1960 г. он подает заявку на конкурс и избирается заведующим кафедрой зоологии позвоночных Белорусского Государственного Университета.

Десятилетний период работы Петра Фомича на биологическом факультете Университета был очень плодотворным. С его именем связано начало широкого использования математических методов в биологии. Здесь он стал читать курсы «Биологическая статистика», «Избранные главы биометрии», а для студентов, специализирующихся по кафедре генетики, спецкурс «Статистическая генетика». На основе этого курса П.Ф. Рокицкий написал книгу «Введение в статистическую генетику» (1-е издание, 1974 г.; 2-е издание, 1977 г.). В этот же период Петр Фомич выпустил учебные пособия для студентов: «Основы вариационной статистики

для биологов» (1962 г.), «Биологическая статистика» (1-е издание, 1964 г.; 2-е издание, 1967 г.; 3-е издание, 1973 г.). Подготовленные и изданные им учебники сыграли значительную роль в развитии биологии в республике.

Обладая обширными, поистине энциклопедическими знаниями в разных областях биологии, Петр Фомич стал инициатором развития на возглавляемой им кафедре экспериментального направления в дополнение к традиционным полевым исследованиям фауны позвоночных животных республики. Так, в 1963 году при кафедре была организована лаборатория, на базе которой проводились исследования в области экологической гематологии и морфологии наземных позвоночных, эволюционной морфологии скелета птиц, экологии питания рыб. Результаты проведенных экспериментальных исследований явились основой для подготовки аспирантами кандидатских диссертаций и дипломных работ студентами кафедры.

Кроме общего курса «Биологическая статистика» Петр Фомич читал курс «Животноводство» и спецкурс студентам кафедры генетики «Генетика популяций». Он обладал редким даром педагога – умением совмещать изложение материала на высочайшем научном уровне с его доступностью. Чтобы облегчить восприятие студентами теоретического материала, он приводил интересные, тщательно отобранные примеры. Лекции Петр Фомич читал живо, эмоционально, на них не было места скуке.

Петр Фомич был одним из самых разносторонне образованных и наиболее уважаемых профессоров. Его лекции и семинары (генетический и математический) были популярны не только среди студентов и преподавателей биологического факультета, но и привлекали всегда большое число слушателей с других факультетов. Хорошее знание многих биологических дисциплин, математики, физики, их умелое сочетание в применении к биологии привлекало своей теоретической и методической новизной.

П.Ф. Рокицкий знал несколько языков, был человеком высокой культуры. Он мастерски сочетал высокий уровень учебно-педагогической работы с исследовательской деятельностью, прививал студентам любовь к научной работе. Он был поистине неутомим, инициативен, изобретателен. У него хватало времени буквально на все.

С 1965 г., когда в СССР признали ошибочность учения Т.Д. Лысенко и классическая генетика была реабилитирована, исследования по радиационной генетике получили более широкое развитие. Начались эксперименты на дрозофиле, классическом объекте генетических исследований, и с 1965 г. Петр Фомич Рокицкий перешел на работу в отпочковавшийся от Института биологии Институт генетики и цитологии АН БССР, где создал и возглавил лабораторию теоретической генетики, которой руководил до последних дней своей жизни (рис. 2, 4).



Рис. 2. П.Ф. Рокицкий с учениками, Институт генетики и цитологии АН БССР, 1967 г.
В первом ряду И.Б. Моссэ, во втором – Е.Г. Берин и Р.И. Гончарова

В лаборатории радиационной генетики проводились как фундаментальные, так и прикладные исследования в различных областях радиационной и популяционной генетики. Большое внимание Петр Фомич уделял изучению индуцированного облучением мутационного процесса на организменном и популяционном уровнях, а также поиску веществ, способных защищать наследственные структуры от влияния ионизирующих излучений. Изучение процессов адаптации популяций к воздействию ионизирующей радиации на фоне антимутагенов позволило выявить ряд новых закономерностей, имеющих важное теоретическое и практическое значение. В лаборатории были получены уникальные результаты изучения сочетанных эффектов ионизирующей радиации и радиопротекторов, а также веществ, используемых в сельском хозяйстве и в промышленности. Эти результаты получили высокую оценку на международном уровне.

Публикации результатов исследований П.Ф. Рокицкий придавал большое значение, считая этот показатель первейшим в оценке деятельности научного работника. Всю продукцию, предназначенную для печати, Петр Фомич проверял лично, советы давал дельные, на исправлениях по специальным вопросам не настаивал, доверяя компетентности сотрудников – чаще всего его замечания касались количественной обработки данных и выводов – по этой части равных ему оппонентов не было.

В эти же годы возникло новое перспективное направление – математическое моделирование

генетических процессов в популяциях. Благодаря усилиям П.Ф. Рокицкого и его учеников Минск вскоре стал одним из признанных центров страны по математической генетике.

За время работы в Институте генетики и цитологии П.Ф. Рокицкий вместе с группой сотрудников разработал методы анализа фенотипической изменчивости и ее компонентов – генетической и средовой, решил ряд вопросов теории и практики селекции животных, используемых для повышения эффективности селекционной работы. Его книги по биологической статистике стали известными во всех уголках Советского Союза и являются надежными помощниками для исследователей до настоящего времени.

Научная деятельность Петра Фомича Рокицкого получила высокую оценку государства и научной общественности. На годовом собрании АН БССР 24–28 февраля 1967 г. он был избран академиком АН БССР.

П.Ф. Рокицкий активно участвовал в организации Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Вавилова, избирался его вице-президентом. Был одним из основателей Белорусского общества генетиков и селекционеров (основано в 1966 г.) и до конца жизни был его бессменным президентом (рис. 3).

Петр Фомич Рокицкий также принимал активное участие в работе Научного Совета по генетике и селекции АН СССР, редакции журнала «Генетика», писал статьи для различных энциклопедий. В Минск приезжали его давние друзья и коллеги, выдающиеся генетики



Рис. 3. Члены Республиканского совета Белорусского общества генетиков и селекционеров. Минск, 1970 г. П.Ф. Рокицкий и Н.В. Турбин в первом ряду в центре

Б.Л. Астауров, Д.К. Беляев, Н.В. Тимофеев-Рессовский, С.М. Гершензон и др. Их выступления на руководимом Петром Фомичем генетическом семинаре хорошо запомнились многим белорусским генетикам.

В последние годы жизни Петр Фомич опубликовал серию работ по истории советской генетики, вкладу в ее развитие таких выдающихся ученых, как Н.К. Кольцов, С.С. Четвериков, А.С. Серебровский, Ю.А. Филипченко, Б.Л. Астауров. Под его редакцией переиздавались классические труды советских генетиков. Вместе с Б.Л. Астауровым он опубликовал в научно-биографической серии АН СССР книгу об основателе Московской школы экспериментальных биологов, своем учителе Н.К. Кольцове

Много внимания уделял П.Ф. Рокицкий философскому осмыслению достижений генетики. Он публикует исследование о влиянии философского наследия Н.К. Кольцова на развитие современной биологии. В 1972 г. выходят работы о научных воззрениях Н.К. Кольцова, в которых дан глубокий анализ тех направлений в науке, которые в свое время разрабатывал Н.К. Кольцов. П.Ф. Рокицкий совместно с Д.К. Беляевым опубликовал статью «О некоторых методологических проблемах развития советской генетики».

Петр Фомич был Ученым и Человеком с большой буквы. Его доброта и сердечность привлекали к нему людей независимо от возраста и положения. Он любил принимать у себя гостей. Атмосферу тепла и гостеприимства поддерживала и его жена, Екатерина Степановна. Петр Фомич рассказывал гостям о годах учебы в Московском государственном университете, периоде работы в Институте экспериментальной биологии, о личности Н.К. Кольцова, о перепетиях его собственной жизни во времена лысенковщины. Обсуждались также и новинки художественной литературы. Он любил литературу и знал ее. В доме была огромная библиотека, как он говорил «третья по счету», так как первые две были потеряны по разным причинам.

В быту Петр Фомич был очень неприспособленным человеком. Часто журил с женой за то, что она излишне много времени тратит на приготовление «мудреных блюд», говорил, что ему достаточно чая и бутерброда с сыром. С тру-

дом соглашался на покупку новой одежды, обуви, мотивируя это тем, что имеющийся у него гардероб вполне еще пригоден.

Петр Фомич был удивительно заботливым руководителем аспирантов и студентов. Он буквально заваливал их соответствующей их темам научной литературой, ссылками на статьи из реферативных журналов. Несмотря на свой высокий научный ранг, был прост и доступен для общения. К нему приходили за научными консультациями и просто за советами мудрого человека сотрудники из Академии наук и других ведомств, студенты и аспиранты, приезжие молодые ученые из разных городов необъятной в те годы страны. Для всех у него хватало времени и внимания.

В 1973 г. ему было присвоено звание заслуженного деятеля науки БССР. В 1974 г. за цикл опубликованных в 1964–1974 гг. работ по статистической генетике и применению математических методов в биологических исследованиях П.Ф. Рокицкому присуждена Государственная премия БССР.

Петр Фомич умер 21 октября 1977 г. Он оставил после себя не только научные труды и идеи, но и достойных учеников – кандидатов и докторов наук. Исследования, начатые под руководством П.Ф. Рокицкого, в настоящее время приобретают все большую актуальность, расширяются и углубляются. В частности, это относится и к разработке способов снижения генетических последствий облучения, которая приобрела после Чернобыльской аварии особое значение. Эти исследования получили высокую международную оценку. Также продолжается начатое П.Ф. Рокицким еще в Сыктывкаре изучение влияния на популяции повышенного радиационного фона.

Многолетние коллективные исследования, выполнявшиеся в лаборатории теоретической генетики по проблемам радиационной, популяционной, математической и экологической генетики явились логическим развитием идей Петра Фомича. Лаборатория теоретической генетики, созданная академиком П.Ф. Рокицким, внесла значительный вклад в развитие теоретической генетики и впоследствии дала начало трем новым лабораториям – радиационной генетики, антимутогенеза, цитогенетики, успешно работавшим долгое время в составе Института генетики и цитологии Националь-

ной Академии наук Беларуси и позже трансформировавшиеся в лаборатории генетики человека, генетики животных, генетической безопасности, моделирования генетических процессов.

Петр Фомич Рокицкий, наряду с академиком Н.В. Турбиным и А.Р. Жебраком, принадлежит к числу отцов-основателей Института, сформировавших его научный профиль. Он

является создателем и воспитателем научной школы, известной своими научными достижениями далеко за пределами своей страны.

По решению Совета Министров БССР в память о П.Ф. Рокицком на здании Института генетики и цитологии НАН Беларуси установлена мемориальная доска. На родине в поселке Криничном Мозырского района в 1981 г. открыт музей академика П.Ф. Рокицкого.



Рис. 4. Сотрудники лаборатории теоретической генетики, 1976 г.

Петр Фомич любил Мозырщину. В течение всей своей жизни он поддерживал связь со своими земляками и много раз приезжал на свою малую родину, интересовался изменениями, происходившими в ее экономической и культурной жизни, а также развитием образования на Полесье. Мозырский учительский институт был создан 15 марта 1944 года Постановлением Совета Народных Комиссариатов БССР. Базой для его создания послужил Рогачевский учительский институт, который функционировал с 1936 года по июнь 1941 года и подготовил более 1000 учителей, плодотворно работавших на уровне народного образования.

В состав Мозырского учительского института входили три отделения: языка и литературы, физико-математическое и историко-географическое. В мае 2002 года институт был преобразован в Мозырский государственный педагогический университет, который сейчас является научным, образовательным и культурным центром Белорусского Полесья.

Преподаватели и студенты Мозырского университета свято чтят наследие и традиции своего края. Мозырщина – родина выдающе-

го сына Белорусского Полесья, имя которого навсегда вписано в книгу истории биологической науки, ученого-исследователя, педагога-академика Петра Фомича Рокицкого.

Преподаватели и студенты принимали участие в создании музея академика П.Ф. Рокицкого, который сейчас размещается в Криничанской общеобразовательной школе Мозырского района. В комнате-музее представлены различные фотодокументы. Есть очень редкие фотографии Н.В. Тимофеева-Рессовского, академиков А.Р. Жебрака, С.М. Гершензона, Б.Л. Астаурова, Л.В. Хотылевой и др. Имеются личные вещи, много книг и научных статей с дарственными надписями от ученых из разных уголков бывшего СССР и зарубежья. Многие писали Петру Фомичу и как бессменному члену редколлегии журнала «Генетика». На стеллажах имеется большой выбор библиографически редкой научной литературы по экологии, радиоэкологии, генетике, зоотехнии, биометрии и другим отраслям науки.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси совместно с Мозырским университетом в 1998 году организовали Научную конференцию, по-

священную 95-летию Петра Фомича Рокицкого, а в 2003 году отметили 100-летие со дня его рождения. На приглашение приехать в Мозырь откликнулись многие известные ученые стран СНГ. Люди стремились побывать на родине Петра Фомича, чтобы вместе с его земляками, учениками и сотрудниками вспомнить великого ученого и прекрасного человека. В 2003 г. к 100-летию юбилею была выпущена книга «Академик П.Ф. Рокицкий», в которой собраны воспоминания его друзей и коллег, приведен список основ-

ных публикаций Петра Фомича, его фотографии.

К настоящему времени в честь академика П.Ф. Рокицкого названа одна из улиц пос. Криничного, а Криничанская школа стала называться «Школа имени академика П.Ф. Рокицкого».

Не только ученые, знавшие труды Петра Фомича, и ученики, которых он вырастил, но и земляки, а также все те, кто знал этого светлого человека, свято чтят его память и отдают дань уважения его сложной, но прекрасной судьбе.

Список использованных источников

1. Академик П.Ф. Рокицкий. Воспоминания современников. – Минск: Право и экономика, 2003. – 116 с.
2. Бабков, А.В. Московская школа эволюционной генетики / А.В. Бабков. – М.: Наука, 1985. – 90 с.
3. Белорусская ССР: энциклопедия. – Минск, 1982. – Т. 5. – С. 533.
4. Большая Советская энциклопедия. – М.: Сов. энциклопедия, 1970. – Т. 3. – С. 146–177.
5. Гайсинович, А.Е. Зарождение генетики / А.Е. Гайсинович. – М.: Наука, 1988. – 91 с.
6. Дудинцев, В.Д. Белые одежды / В.Д. Дудинцев. – М.: Сов. Писатель, 1988. – 512 с.
7. Дубинин, Н.П. Вечное движение / Н.П. Дубинин. – М.: Политиздат, 1973. – 417 с.
8. Личное дело Рокицкого П.Ф. / Научный архив КНЦ УО АН СССР. Ф. 1. Оп. 19, № 350. – 65с.
9. Общество по распространению политических и научных знаний. ЦГА Коми АССР, фонд 1306. – 164, 166.
10. О развитии генетики в СССР // Генетика. – М.: Наука, 1989. – № 5. – С. 967–975.
11. Отчет об экспедиции в районы Крайнего Севера Коми АССР. Печорская с.-х. экспедиция, 1950 // Научный архив КНЦ УО АН СССР, ф. 1, оп. 3, № 227. – 100 л.
12. Рокицкий, П.Ф. Автобиография // Архив Национальной Академии наук Беларуси. – г. Минск.
13. Рокицкий, П.Ф. Борис Львович Астауров: материалы к библиографии ученых СССР / П.Ф. Рокицкий. – М.: Наука, 1972. – 182 с.
14. Рокицкий, П.Ф. Научные воззрения Н.К. Кольцова / П.Ф. Рокицкий // Вопросы философии. – 1972. – № 7. – С. 90–101.
15. Рокицкий, П.Ф. Н.К. Кольцов и современная биология (воспоминания и сопоставления) // Неман. – 1972. – № 10. – С. 141–146.
16. Рокицкий, П.Ф. С.С. Четвериков и эволюционная генетика // Природа. – М.: Знание, 1974. – № 2. – С. 70–74.
17. Рокицкий, П.Ф. Николай Константинович Кольцов / П.Ф. Рокицкий, Б.Л. Астауров. – М.: Наука, 1975. – 6, 184.
18. Рокицкий, П.Ф. О некоторых методологических проблемах развития советской генетики / П.Ф. Рокицкий, Д.К. Беляев. – М.: Вопросы философии, 1977. – № 2–3. – 5, 186.
19. Рокицкий, П.Ф. Н.К. Кольцов / П.Ф. Рокицкий // Выдающиеся советские генетики. – М.: Наука, 1980. – С. 49–56.
20. Фолта, Я. История естествознания в датах / Я. Фолта, Л. Новы. – М.: Прогресс, 1987. – С. 222–224.
21. Фролов, И.Т. Философия и теория генетики. Поиски и дискуссии / И.Т. Фролов. – М.: Наука, 1988. – 89 с.
22. Шумный, В.В. За истину в науке / В.В. Шумный // Наука и жизнь. – 1987. – № 12. – С. 62–65.

Дата поступления статьи 1 июля 2013 г.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В СЕЛЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ВИРУСАМ (обзорная статья)

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

Введение

В настоящее время при создании сорта картофеля комбинируется более 50 различных признаков. К их числу относятся и устойчивость к болезням и вредителям, которые вызывают снижение урожая и качества получаемой продукции. Особое значение занимает выведение вирусостойчивых сортов, так как вирусы способны накапливаться в клубнях. При посадке с использованием инфицированных семян происходит быстрое вырождение сортов [1]. По этой причине некоторые сорта снимаются с районирования или вообще не районированы [2]. Получение оздоровленного материала требует дополнительных затрат, необходима сертификация посадочного материала. Химзащита от насекомых-переносчиков вирусов также связана с дополнительными материальными затратами. Кроме того, она увеличивает пестицидную нагрузку на окружающую среду. В связи с этим выведение устойчивых к вирусам сортов является не только экологически чистым, но и экономически выгодным способом защиты. Для успешной селекции необходимо располагать источниками устойчивости. Повышению эффективности селекции способствует использование молекулярных маркеров к генам резистентности. Их применение позволяет проводить отбор на стадии семян в год получения гибридного материала, в то время как при оценке по фенотипу на инфекционных фонах используются клубневые поколения гибридов и требуется проведение оценок в течение ряда лет. Применение молекулярных маркеров к разным генам устойчивости для отбора ценных генотипов позволяет выявлять те из них, которые несут конкретные гены устойчивости, что невозможно при фитопатологической оценке. Кроме того, появление некротических штаммов, вызывающих по-

вреждение клубней и проявляющихся в виде мягких симптомов на листьях, не позволяет проводить браковку на основе фитопатологических оценок. Известно также, что для предотвращения генетической эрозии следует создавать сорта, различающиеся по генам устойчивости к одному виду вируса. Это позволит внедрить стратегию диверсификации сортов, которая способствует продлению устойчивости [3]. В связи с этим в Республике Беларусь необходимо использовать маркер-сопутствующую селекцию (MAS – marker assisted selection) картофеля на постоянной основе при реализации селекционных программ, а не только при выполнении научных проектов.

В Беларуси, которая является страной, широко производящей и потребляющей картофель, большое значение имеет создание сортов, устойчивых к Y-, L-, M- вирусам, которые включены в «Перечень особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков» Республики Беларусь [4]. Следует также обратить внимание и на другие вирусы, в частности, S-, X-, A-, которые не только распространены в посадках картофеля в стране [5–8], но способны синергически взаимодействовать с некоторыми видами вирусов при смешанной инфекции [9]. Эффект синергизма проявляется в том, что один вирус супрессирует механизмы генного сайленсинга, обусловленные растением-хозяином, которые держат под контролем второй вирус. Так, например, PVS (*Potato virus S*) синергически индуцирует тяжелые симптомы при смешанной инфекции с PVA (*Potato virus A*) и PVY (*Potato virus Y*) [10]. В связи с этим комплексная инфекция растений является большой проблемой для картофелеводства.

Типы устойчивости картофеля к вирусным болезням

Для реализации селекционных программ важен выбор генов устойчивости, которые обуславливают тот или иной тип устойчивости. Выделяют три основных типа устойчивости картофеля к вирусам: крайнюю устойчивость, локализованную сверхчувствительность и полевую устойчивость.

При крайней устойчивости (ER – extreme resistance), контролируемой моногенными доминантными *R*-генами, выявляется очень низкое количество вирусных частиц в растениях [11–13] в результате его ограниченного размножения или локализации вирусной инфекции в растениях без явных некротических реакций. Растения не имеют симптомов поражения вирусом, но для некоторых генотипов может наблюдаться очень ограниченный системный некроз (точечные поражения на верхних листьях) после инокуляции прививкой [12]. Хотя этот тип устойчивости действует против всех штаммов одного вида вируса, экспрессия ER может вызвать неспецифическую устойчивость и к другим видам вирусов, по крайней мере, на уровне единичных клеток в протопластах [14].

Сверхчувствительность (HR – hypersensitivity) контролируется доминантными *N*-генами, которые являются специфичными к определенным штаммам и, в отличие от ER, не обеспечивают устойчивости на уровне протопластов [11, 15]. При сверхчувствительной реакции происходит локализация вирусной инфекции вследствие некроза первично инфицированных участков зараженных листьев или системного некроза растения [16–19]. Сверхчувствительность может проявляться в нескольких клетках в первичном участке инфицирования в виде некротических точечных поражений при отсутствии системного распространения вируса [16]. Листья, обнаруживающие некротические симптомы, содержат детектируемое количество вируса, в отличие от листьев, имеющих «точечные поражения» на растениях, защищенных ER [13, 20–22]. Однако локализации вируса при HR может не произойти из-за изменений условий окружающей среды, таких как более высокая температура, уменьшение интенсивности освещенности или неподходящий возраст растений [23]. При этом следует иметь в виду, что

устойчивость зрелого растения не является вирус - специфической и зависит от стадии развития растения [24]. В генотипах картофеля, несущих *N*-гены, например, к PVY, в результате системных инфекций развивается некроз клубней, стеблей, листьев и верхушек растений или происходит гибель целого растения [25, 26]. HR может не блокировать сосудистый транспорт вируса. Если происходит системное заражение, некротические симптомы развиваются в верхней части растения, например, после заражения прививкой [26]. Типы устойчивости ER и HR существуют к PVX (*Potato virus X*), PVY, PVA, PVV (*Potato virus V*), PVM (*Potato virus M*) и PVS в сортах, селекционных линиях и диких видах [27] и имеют моногенный контроль к этим видам вирусов [11, 26, 28–30].

Рассматривают также умеренную устойчивость (MR – moderate resistance) [15]. Это такая устойчивость, при которой вирус либо ограничен в месте инфекции, либо может медленно системно передвигаться по флоэме и не достигать клубней. Таким образом, значительная концентрация вируса наблюдается только в первично инфицированной ткани, или вирус может находиться в низкой концентрации во всех органах растения [15]. Доза содержащейся инфекции в этом случае зависит от количественной устойчивости к передаче вируса контактным способом или тлей [31]. Это используется в селекции картофеля на устойчивость к PVX, PVY, PVA, PVS и PLRV (*Potato leafroll virus* – вирус скручивания листьев) [32].

Полевая устойчивость характеризуется полигенной природой. Считается, что степень ее проявления не имеет значительных вариаций в зависимости от штаммового состава вируса. Генетические подходы селекции на полевую устойчивость картофеля к вирусам пока разработаны недостаточно. Тем не менее, определение QTLs (quantitative trait loci – количественных локусов) может упростить анализ количественной устойчивости и позволит создавать устойчивые сорта на постоянной основе использования QTLs-аллелей.

Устойчивость к PLRV имеет сложную генетическую природу в сравнении с другими вирусами. Barker выделил три основных компонента устойчивости к PLRV: 1) устойчивость

к заражению; 2) ограничение размножения вируса (устойчивость к накоплению вируса); 3) ингибирование передвижения вируса от листьев к клубням [33]. Наибольшую ценность представляет многокомпонентная устойчивость, когда комбинируются эффекты всех ее типов. Только в немногих сортах, но в большей степени в селекционных линиях и диких видах, присутствует устойчивость к заражению, аккумуляции или передвижению PLRV [27]. К вирусу скручивания листьев проводится селекция на полевую устойчивость [32]. Под полевой устойчивостью к PLRV обычно понимают устойчивость к заражению, но она может быть преодолена, если имеется сильный инфекционный фон [34]. Для использования в селекционных программах в будущем уже получены клоны с устойчивостью к заражению, накоплению и передвижению PLRV [35].

Некоторые исследователи также выделяют такой тип устойчивости к вирусам, как толерантность, или выносливость растений. Вирусные инфекции в этом случае протекают

бессимптомно [36]. Толерантность действует продолжительно, поскольку популяция патогена сохраняется в равновесии и не контролируется генами устойчивости [37]. Показано, что наследуемость этого признака низка [39]. Однако содержащие вирус толерантные генотипы являются источниками инфекции для других растений.

Для L-вируса картофеля также известен такой тип устойчивости, как интолерантность (системная сверхчувствительность). Он характеризуется способностью растения сильно поражаться при низкой инфекционной нагрузке. При заражении ботва некротизируется полностью и клубни либо не образуются, либо вырастают очень мелкие. Потомство клубней, собранных с выживших инфицированных растений этих сортов, либо не прорастает, либо дает нитевидные ростки, которые чахнут вскоре после появления всходов, то есть самоуничтожаются. Это надежный тип устойчивости для семеноводства, т.к. он приводит к самоэлиминации больных растений.

Гены устойчивости картофеля к вирусам

Экспрессия *N*-генов сверхчувствительности может давать полезную штаммоспецифическую полевую устойчивость картофеля [11, 26]. По мнению ряда исследователей, HR обеспечивает хорошую защиту от распространения вируса в поле [40, 41], но условия окружающей среды, физиология растения-хозяина и возникновение штаммов вируса, не узнаваемых контролирующим HR-геном, могут ограничить ее эффективность [26, 40]. В связи с этим особую важность для селекции представляют *R*-гены крайней устойчивости. Для X-вируса это гены Rx_{acl} ($Rx2$) от *Solanum acaule* и Rx_{adg} ($Rx1$) от *S. andigenum*, картированные в 5 и 12 хромосомах соответственно [42]. Для Y-вируса известны гены Ry_{adg} , Ry_{sto} , Ry_{che} , картированные в 11, 12, 9 хромосомах. Гены Ry_{sto} от *S. stoloniferum* [12, 13] и Ry_{adg} от *S. andigenum* [43] обуславливают групповую устойчивость к различным штаммам PVY и широко используются в селекционных программах. Существует два независимых источника гена Ry_{sto} : ген Ry_{sto} , ассоциированный с мужской стерильностью [12] и $Ry-f_{sto}$ (fertile). Устойчивость европейских сортов к PVY обусловлена, главным образом, геном Ry_{sto} . В селекционных программах Северной и Южной

Америки широко используется Ry_{adg} . Ген Ry_{che} , привнесенный от *S. chacoense*, интрогрессирован в японские сорта картофеля.

В разных образцах *S. stoloniferum* ER к PVY косегрегирует с ER или HR к PVA и PVV. Это объясняется узнаванием одним геном устойчивости (Ry_{sto}) нескольких генов авирулентности разных видов вирусов или наличием в локусе Ry_{sto} нескольких тесно сцепленных генов, управляющими вирус-специфической устойчивостью [11, 13]. Крайняя устойчивость к PVY, происходящая от *S. andigenum*, сцеплена с ER к PVX [44] и PVA [22, 45]. Однако по данным Hämäläinen с соавторами устойчивость к PVY и PVA, обуславливаемая Ry_{adg} , контролируется отличающимися локусами [22]. Т.е. Ry_{adg} представляет транслокацию, содержащую два гена устойчивости к PVY и PVA.

Устойчивость к S-вирусу обусловлена главным доминантным геном сверхчувствительности *Ns*, который был успешно интродуцирован в ряд сортов картофеля из *Solanum andigenum* [46–48]. Растения, экспрессирующие ген *Ns*, не имеют визуальных симптомов при механической инокуляции. Ген *Ns* картирован в 8 хромосоме [48].

Устойчивость к М-вирусу контролируется двумя известными генами. Ген *Rm* индуцирует сверхчувствительную реакцию в растениях картофеля [29]. Сорта картофеля, обладающие геном *Rm*, не заражаются PVM, но после механической инокуляции на листьях таких устойчивых сортов могут появляться некротические пятна. Отдельные зараженные PVM растения могут погибать преждевременно (типичная реакция сверхчувствительности), инфицированные клубни имеют внутренний сухой некроз паренхимы. Некротическая реакция может наблюдаться и на растениях, инокулированных прививкой [49]. Доминантный ген *Gm* дает ER тип устойчивости и обуславливает резистентность к заражению PVM. В сортах картофеля, несущих этот ген, PVM не распространяется в растениях после механической инокуляции. Наличие частиц PVM может быть обнаружено лишь случайно в растениях, инокулированных прививкой [49, 50]. Локус *Gm* был картирован в центральном районе 9 хромосомы картофеля [51]. Локус *Rm* размещен в коротком плече 11 хромосомы, где в геномах картофеля и томата находится горячая точка для моногенной и полигенной устойчивости к ряду патогенов [51]. Ген *Rm* является первым геном вирусостойчивости, определенным в этом кластере.

Ген *Gm* пока еще присутствует только в исходном материале, полученном в Польше в 1993 году [45, 52]. Первые родительские линии с геном *Rm* были получены польскими селекционерами в 1985 году [45]. Сейчас в Польше созданы сорта с геном *Rm*: *Ametyst*, *Eugenia*, *Finezja*, *Kogona* [52]. По результатам оценки 196 сортов (из них 100 польской селекции) только 3 польских сорта показали выдающуюся устойчивость к М-вирусу: *Triada* (зарегистрированный в 1996 г.), *Kogona* (2002 г.) и *Kuklik* (2003 г.) [53]. В сортах *Triada* и *Kogona* ген *Rm* происходит от родительских селекционных линий. Сорт *Kuklik* получен от скрещивания сортов *Irga* и *Aster*. По мнению Ross H., сорта картофеля экспрессируют различные уровни устойчивости к PVM [12].

Селекция на устойчивость к PLRV была охарактеризована как трудная из-за сложного генетического контроля устойчивости [54, 55]. Marczewski с сотрудниками [56, 57] картировали 4 количественных локуса, обуславливающих устойчивость к размножению

(накоплению) вируса. Основными из них являются *QTLPLRV.1* и *QTLPLRV.4*, а малыми – *QTLPLRV.2* и *QTLPLRV.3*. Оба локуса *QTLPLRV.1* и *QTLPLRV.4* картированы в 11 хромосоме, но наследуются независимо. Количественный локус *QTLPLRV.1* находится в горячей точке, имеющей несколько генов качественной и количественной устойчивости к вирусам и другим патогенам картофеля. Этот QTL контролирует от 50 до 60% фенотипической вариации признака. Два малых *QTLPLRV.2* and *QTLPLRV.3* картированы в 6 и 5 хромосомах соответственно. В родословной исследованных диплоидных клонов, которые несут *QTLPLRV.1* – *QTLPLRV.3*, присутствуют наряду с *S. tuberosum* также виды *S. chacoense*, *S. yungasense*. Малые QTLs не влияют на экспрессию *QTLPLRV.1*, а самостоятельно вносят вклад в общий уровень устойчивости и могут рассматриваться как генетический фон, который модифицирует устойчивость [56]. Это подтверждается более ранними наблюдениями о том, что генетический фон может влиять на проявляющийся уровень устойчивости к PLRV, обуславливаемый основным геном [58, 59]. Присутствие основного гена без соответствующего генетического фона недостаточно защищает растения от вируса [58].

В некоторых научных статьях указывалось на наличие моногенной доминантной устойчивости к PLRV, обуславливаемой главным геном *Nl* системной сверхчувствительности (интолерантности), который вызывает системный некроз [60–62, 46–48]. *Zadina* и *Novak* показали, что у интолерантного сорта *Apta* ген *Nl* представлен в симплексном состоянии [62]. Однако *Ross*, а также *Butkiewicz* сообщали, что сверхчувствительность к PLRV, проявляющаяся как системный некроз, контролируется главным доминантным геном *Nl* и модифицируется несколькими малыми генами [12, 60]. Как отмечалось выше, самоуничтожение больных растений-носителей гена *Nl* является реакцией на вторичную инфекцию PLRV, характерную для интолерантных генотипов картофеля [60, 61]. Системная сверхчувствительность выявлена у диких видов *S. berthaultii*, *S. fendleri*, *S. simplicifolium*. Этим типом устойчивости обладает ряд диплоидных клонов [63] и тетраплоидных сортов картофеля, в том числе *Apta* и *Carla* [64]. В родословной сорта *Carla* присутствует *Apta*. Сорта *Apta* и

Carla, а также интолерантные сорта Ida, Monza, Sedira созданы немецкими селекционерами, а интолерантный сорт Kama – польскими [65]. По данным Salazar, интолерантность сортов Apta и Carla контролируется полигенно [66].

Ранее считалось, что к PLRV может встречаться и крайняя устойчивость [67]. Однако сейчас доказано обратное [68]. Отечественный и зарубежный опыт оценки на устойчивость к PLRV показал, что в природе пока не найдено доминантных генов крайней устойчивости и локализованной сверхчувствительности к этому вирусу [65]. Главный ген устойчивости к вирусу скручивания листьев (PLRV) Rl_{adg} выявлен в ландрасе LOP-868 (местный сорт Alca Tarma), принадлежащей к *S. andigenum*, которая была собрана в Перу (табл.) [69]. Этот ген контролирует меха-

низм устойчивости, характеризующийся высоким уровнем наследования к заражению вирусом PVX в сочетании с умеренным уровнем устойчивости к накоплению вируса при инокуляции растений прививкой. Устойчивость к заражению PLRV была получена долговременно адаптированными сортами подвидов *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L. и *S. tuberosum* ssp. *andigena* благодаря интрогрессии от *S. demissum* Lindl. как случайный побочный продукт селекции на устойчивость к фитофторозу [70]. По мнению Davidson, устойчивость к заражению PLRV была привнесена в родословные многих сортов от сорта Aquila [32]. Ген устойчивости к накоплению и передвижению вируса Rlr_{etb} был привнесен от *Solanum etuberosum* и картирован в 4 хромосоме (табл.) [71, 72].

Картированные гены устойчивости картофеля к L-вирусу

Ген устойчивости	Тип устойчивости	Хромосома	Источник	Литературные ссылки
Rl_{adg}	К заражению и накоплению	5	<i>S. andigenum</i>	[69]
Rlr_{etb}	К накоплению и передвижению	4	<i>S. etuberosum</i>	[71, 72]
QTLPLRV1*	К накоплению	11	<i>S. tuberosum</i> *	[56]
QTLPLRV2*	К накоплению	6	<i>S. tuberosum</i> *	[56]
QTLPLRV3*	К накоплению	5	<i>S. tuberosum</i> *	[56]
QTLPLRV4*	К накоплению	11	<i>S. tuberosum</i>	[56]

* – эти гены могли также быть привнесены с генетическим материалом видов *S. chacoense*, *S. yungasense*.

Селекция на длительную устойчивость является заманчивой целью. Согласно Johnson [73], длительность устойчивости может быть определена только после крупномасштабного выращивания сортов. Не выявлено никакой четкой связи между генетикой вирусоустойчивости и ее длительностью [36]. Предсказание длительности устойчивости в начале селекционных программ представляет собой серьезную проблему и опирается на знание факторов, которые могут влиять на длительность. Для более точного предсказания длительности устойчивости может иметь значение выявление генов вирулентности. Harrison [74] показал, что число аминокислотных замещений, необходимое для вирулентности, было связано с длительностью устойчивости. В некоторых случаях одна мутация достаточна, чтобы превратить авирулентный изолят в

вирулентный, преодолевающий устойчивость (например, для PVX) [75], что обуславливает малую длительность соответствующего гена резистентности. Длительность устойчивости может также сильно зависеть от плотности и географического распространения растений-хозяев и/или популяций векторов, физической среды (например, климата), а также выбора видов сельскохозяйственных культур и генотипов, торговли или ввоза зараженных растений или семян. Все это может увеличить размер популяции вируса и повысить вероятность его распространения в агроэкосистемах [36].

Известно, что разные гены устойчивости к одному и тому же виду вирусов отличаются по длительности их эффективности. Гены крайней устойчивости проявляют особенно длительную устойчивость [14, 76–78]. Было также показано, что QTLs с малыми эффектами на

устойчивость могут значительно увеличить длительность устойчивости, обусловленной главным геном резистентности [79].

Пролить свет на длительность устойчивости может изучение генов авирулентности, кодирующих элиситоры, и возможностей вируса не терять приспособленность, когда эти гены вследствие мутаций или других механизмов изменчивости превращаются в гены вирулентности. Сейчас известно, что элиситорами X-вируса являются вирусные белки. Так, реакция устойчивости по типу сверхчувствительности у растений с геном *Nb* вызывается 25-кДа белком, обуславливающим передвижение PVX. Сверхчувствительность у растений с геном *Nx* и крайняя устойчивость у растений с геном *Rx* вызывается белком оболочки вируса (CP) и эффективна против неродственных вирусов, таких как CMV (*Cucumber mosaic virus* – вирус огуречной мозаики) [75].

Заключение

Создание вирусостойчивых сортов имеет большое значение в связи с тем, что вирусы накапливаются в клубнях и приводят к вырождению сортов. Особую ценность представляют сорта с групповой устойчивостью к разным видам вирусов, что обусловлено синергическим взаимодействием некоторых из них при смешанной инфекции растений. Гены крайней устойчивости обеспечивают более длительную резистентность, чем гены сверх-

Показано, что достаточно одной или двух замен нуклеотидов в генах, кодирующих белки-элиситоры X-вируса для того, чтобы устойчивость была разрушена [74].

Особой длительностью характеризуются гены крайней устойчивости к PVY. Пока ни один изолят PVY не в состоянии преодолеть ген *Ry*. Фактором авирулентности, комплементарным этому гену устойчивости, является кодируемая вирусом NIa-протеаза [80]. Она обеспечивает основу для абсолютной длительности гена *Ry*. Известно, что во время репликации РНК вируса переводится в большой белок. NIa-протеаза расщепляет этот полипротеин в нескольких специфических сайтах, чтобы производить функциональные продукты. Отсутствие любого из этих рестрикторов, вероятно, будет летальным, что и обеспечивает длительную эффективность генов крайней устойчивости к PVY.

чувствительности. Маркер-сопутствующий отбор повышает эффективность селекции на вирусостойчивость. Использование количественных локусов устойчивости предпочтительно для создания сортов с полевой резистентностью. Применение разработанных ПЦР-маркеров к генам вирусостойчивости облегчает комбинирование генов резистентности к разным видам вирусов в одном сорте и отбор желаемых генотипов.

Список использованных источников

1. Жукова, М.И. Экономическое значение вирусных болезней при возделывании семенного картофеля в Беларуси / М.И. Жукова // Известия Академии аграрных наук Республики Беларусь. – 1999. – № 4. – С. 46–48.
2. Альсмик, П.И. О районировании сортов картофеля / П.И. Альсмик, С.И. Гребенщикова // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. – 1983. – № 4. – С. 66–68.
3. Finckh, M.R. Diversification Strategies / M.R. Finckh, M.S. Wolfe. // The Epidemiology of Plant Diseases (Cooke B.M., Jones D.G., Kaye B., eds.). – Netherlands: Springer. – 2006. – P. 269–307.
4. Об утверждении перечня особо опасных вредителей, болезней растений и сорняков: Постановление Министерства

- сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 22.08.2006 № 48 // Государственный реестр СЗР и удобрений [Электронный ресурс] / ГУ «Главная государственная инспекция по семеноводству, карантину и защите растений». – Минск, 2006.
5. Блоцкая, Ж.В. Вирусные, вириодные и фитоплазменные болезни картофеля / Ж.В. Блоцкая. – Минск: Тэхналогія. – 2000. – 119 с.
6. Блоцкая, Ж.В. Вирусные болезни картофеля / Ж.В. Блоцкая. – Минск: Навука і тэхніка. – 1993. – 222 с.
7. Сорока, С.В. Вирусы и вирусные болезни сельскохозяйственных культур / С.В. Сорока, Ж.В. Блоцкая, В.В. Вабищевич. – Несвиж: Несвиж. Укрупн. Тип. Им. С. Будного. – 2009. – 128 с.

8. Русецкий, И.В. Изучение распространности вирусных болезней картофеля в Витебской области / И.В. Русецкий, В.А. Козлов, А.В. Нашинский // Земляробства і ахова раслін. – 2007. – № 4. – С. 44–47.
9. Syller, J. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections / J. Syller // Molecular plant pathology. – 2012. – Vol. 13, № 2. – P. 204–216.
10. Analysis of Iranian *Potato virus S* isolates / K. Salari [et. al.] // Virus Genes. – 2011. – Vol. 43, № 2. – P. 281–288.
11. Cockerham, G. Genetical studies on resistance to *Potato viruses X* and *Y* / G. Cockerham // Heredity. – 1970. – Vol. 25. – P. 309–348.
12. Ross, H. Potato Breeding – Problems and Perspectives / H. Ross // Advances in Plant Breeding. – 1986. – Supplement 13. – Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg, Germany.
13. Barker, H. Inheritance of resistance to *Potato viruses Y* and *A* in progeny obtained from potato cultivars containing gene *Ry*: Evidence for a new gene for extreme resistance to PVA / H. Barker // Theoretical and Applied Genetics. – 1996. – Vol. 93. – P. 710–716.
14. A *Potato virus X* resistance gene mediates an induced, nonspecific resistance in protoplasts / B.A. Köhm [et. al.] // Plant Cell. – 1993. – Vol. 5. – P. 913–920.
15. Resistance specificities to viruses in potato: Standardization of nomenclature / J.T. Valkonen [et. al.] // Plant Breeding. – 1996. – Vol. 115. – P. 433–438.
16. Cadman, C.H. Autotetraploid inheritance in potato: some new evidence / C.H. Cadman // Journal of Genetics. – 1942. – Vol. 44. – P. 33–52.
17. Clinch, P.E.M. The identity of the top-necrosis virus in up-to-date potato / P.E.M. Clinch // Sci. Proc. Royal Dublin Soc. – 1942. – Vol. 23. – P. 18–34.
18. Arenz, B. Die Ausbreitung der Viruskrankheiten (BlattroU- und Strichelkrankheit) der Kartoffel in Abhängigkeit von Sorte und Umweltbedingungen / B. Arenz. – Bayer. Landw. – Jahrbuch 33. – 1956. – P. 657–674.
19. Baerecke, M.-L. Blattrollresistenzzuchtung 3 / M.-L. Baerecke // Handbuch der Pflanzenzuchtung – Paul Parey, Berlin and Hamburg, Germany. – 1958. – P. 97–106.
20. Barker, H. Extreme resistance to *Potato virus V* in clones of *Solanum tuberosum* that are also resistant to *Potato viruses Y* and *A*: Evidence for a locus conferring broad-spectrum potyvirus resistance / H. Barker // Theoretical and Applied Genetics. – 1997. – Vol. 95. – P. 1258–1262.
21. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to *Potato virus Y* / J.H. Hämmäläinen [et. al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 1997. – Vol. 94. – P. 192–197.
22. Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato *Y* and *A* *Potyvirus*s in potato / J.H. Hämmäläinen [et. al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 1998. – Vol. 96. – P. 1036–1043.
23. Matthews, R.E.F. Plant Virology / Matthews, R.E.F. – 3rd ed. – New York: Academic Press, Inc. – 1991. – P. 231–237.
24. Beemster, A.P.R. Virus translocation and mature-plant resistance in potato plants / A.P.R. Beemster // Viruses of Potatoes and Seed Potato Production. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation. – 1987. – P. 116–125.
25. De Bokx, J.A. *Potato virus Y* / J.A. De Bokx, H. Huttinga // Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists (Descriptions of Plant Viruses). Kew, UK. – 1981. – № 242.
26. Jones, R.A.C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with *Potyvirus*s in potato cultivars / R.A.C. Jones // Annals of Applied Biology. – 1990. – Vol. 117. – P. 93–105.
27. Solomon-Blackburn, R.M. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches / R.M. Solomon-Blackburn, H. Barker // Heredity. – 2001. – Vol. 86. – P. 17–35.
28. Hutton, E.M. The relationship between necrosis and resistance to virus *Y* in the potato. 2. Some genetical aspects / E.M. Hutton // J. Com. Sci. Industr. Res. Aust. – 1945. – Vol. 18. – P. 219–224.
29. Dziewonska, M.A. Necrotic reaction to *Potato virus M* in *Solanum stoloniferum* and *Solanum megistacrolobum* / M.A. Dziewonska, K. Ostrowska // Phytopathoi. Zeitschr. – 1977. – Vol. 88. – P. 172–179.
30. Makarov, P.P. Inheritance of resistance to *Potato virus S* / P.P. Makarov // Potato Research. – 1975. – Vol. 18. – P. 326–329.
31. Wiersema, H.T. Breeding for resistance / H.T. Wiersema; ed. J.A. de Bokx // Viruses of

Potatoes and Seed-Potato Production. – Pudoc, Wageningen. – 1972. – P. 174–178.

32. Davidson, T.M.W. Breeding for resistance to virus disease of the potato (*Solanum tuberosum*) at the Scottish plant breeding station / T.M.W. Davidson // Scottish Plant Breeding Station fifty-ninth annual report 1979–80. – Scottish Plant Breeding Station, Pentlandsfield. – 1980. – P. 100–108.

33. Barker, H. Multiple components of the resistance of potatoes to *Potato leafroll virus* / H. Barker // Annals of Applied Biology. – 1987. – Vol. III. – P. 641–648.

34. Beekman, A.G.B. Breeding for resistance / A.G.B. Beekman // Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production; eds. J.A. de Bokx, J.P.H. van der Want. – Pudoc, Wageningen. – 1987. – P. 162–170.

35. Solomon-Blackburn, R.M. Mechanism of strong resistance to *Potato leafroll virus* infection in a clone of potato (*Solanum tuberosum*) / R.M. Solomon-Blackburn, J. Nikan, H. Barker // Annals of Applied Biology. – 2008. – Vol. 152. – P. 339–347.

36. Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability / P. Gomez [et. al.] // Eur J Plant Pathol. – 2009. – Vol. 125. – P. 1–22.

37. Umaerus, V. Race specific and non race specific resistance / V. Umaerus // Sver. Utsadesforen Tidskr. – 1971. – P. 40–43.

38. Tolerance of spring barley cultivars to leaf rust, *Puccinia hordei* / T. Kramer [et. al.] // Euphytica. – 1980. – Vol. 29. – P. 209–216.

39. Resistance to *Potato virus Y* and *Potato virus X* in *Solanum brevidens* / R.W. Gibson [et al.] // Annals of Applied Biology. – 1990. – Vol. 116. – P. 151–156.

40. Ross, H. Studies on mosaic resistance in the potato / H. Ross // Proc. Conf. Potato Virus Dis. – Wageningen-Lisse, The Netherlands. – 1952. – P. 40–47.

41. Bagnall, R.H. Resistance to virus S in the potato / R.H. Bagnall, D.A. Young // American Journal of Potato Research. – 1972. – Vol. 49. – P. 196–201.

42. RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to *Potato virus X* (PVX) / E. Ritter [et. al.] // Molecular and General Genetics. – 1991. – Vol. 227. – P. 81–85.

43. Valkonen, J.T. Natural Genes and Mechanisms for Resistance to Viruses in Cultivated and Wild Potato Species (*Solanum* spp.) / J.T. Valkonen // Plant Breeding. – 1994. – Vol. 112. – P. 1–16.

44. Eva: A Midseason Golden Nematode – and Virus-resistant Variety for Use as Tablestock or Chipstock / R.L. Plaisted [et. al.] // American Journal of Potato Research. – 2001. – Vol. 78. – P. 65–68.

45. Zimnoch-Guzowska, E. Breeding research for main virus resistance in potato / E. Zimnoch-Guzowska // Potato Research. – 2010. – Vol. 53. – P. 199–252.

46. Foxe, M.J. Breeding for viral resistance: conventional methods / M.J. Foxe // Neth. J. Pl. Path. – 1992. – Vol. 98, Supplement 2. – P. 13–20.

47. Marczewski, W. Identification of RAPD markers linked to the *Ns* locus in potato / W. Marczewski, K. Ostrowska, E. Zimnoch-Guzowska // Plant Breeding. – 1998. – Vol. 117. – P. 88–90.

48. Marczewski, W. The *Potato virus S* resistance gene *Ns* maps to potato chromosome VIII / W. Marczewski, J. Hennig, C. Gebhardt // Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – Vol. 105. – P. 564–567.

49. Mietkiewska, E. Reaction of potato clones with different type of resistance to *Potato virus M* (PVM) / E. Mietkiewska // Phytopath. Polonica. – 1994. – Vol. 8. – P. 27–33.

50. Dziejowska, M.A. Resistance to *Potato virus M* in certain potato species / M.A. Dziejowska, K. Ostrowska // Potato Research. – 1978. – Vol. 21. – P. 129–131.

51. Potato chromosomes IX and XI carry genes for resistance to *Potato virus M* / W. Marczewski [et al.] // Theor Appl Genet. – 2006. – Vol. 112. – P. 1232–1238.

52. Reakcja na wirusy odmian ziemniaka znajdujących się w Krajowym Rejestrze w 2010 roku / M. Chrzanowska [et. al.] // Biuletyn Instytutu hodowli i aklimatyzacji roślin. – 2011. – NR 260/261. – P. 309–324.

53. Zagorska, M. Analysis of the results of studies conducted in 1973–2005 on reaction of potato cultivars to *Potato virus M* / M. Zagorska, M. Chrzanowska // Biuletyn instytutu hodowli i aklimatyzacji roślin. – 2007. – NR 243. – P. 227–234.

54. Swiezynski, K.M. Inheritance of the *Potato leafroll virus* (PLRV) in the potato / K.M. Swiezynski, M.A. Dziejowska, K. Ostrowska // Abstracts of the 11th triennial con-

ference of the European association for potato research. European Association for Potato Research, UK. – 1990. – P. 538–539.

55. Resistance to *Potato leafroll virus* multiplication is under major gene control / H. Barker [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1994. – Vol. 88 – P. 754–758.

56. A major quantitative trait locus for resistance to *Potato leafroll virus* is located in a resistance hotspot on potato chromosome XI and is tightly linked to *N*-gene like markers / W. Marczewski [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2001. – Vol. 14. – P. 1420–1425.

57. Two allelic or tightly linked factors at the *PLRV4* locus on potato chromosome XI control resistance to *Potato leafroll virus* accumulation / W. Marczewski [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2004. – Vol. 109. – P. 1604–1609.

58. Swiezynski, K.M. Inheritance of resistance to viruses / K.M. Swiezynski // *Potato Genetics* (Bradshaw J.E., Mackay G.R., eds.). – CAB Int., Wallingford, U.K. – 1993. – P. 339–363.

59. Flis, B. Progeny tests to identify diploid potato clones homozygous at loci controlling resistance to PLRV / B. Flis, I. Wasilewicz-Flis // *Potato Research*. – 1998. – Vol. 41. – P. 219–228.

60. Butkiewicz, H. Intolerance to *Potato leafroll virus* (PLRV) occurring in potato plants / H. Butkiewicz // *The Potato*. – Ziemniak. – 1978. – P. 5–37.

61. Zadina, J. Extreme intolerance to *Potato leafroll virus* and its utilization in the breeding of potatoes / J. Zadina // *Ved. Pr. Vyzk. Slecht. Ost. brambor. v Havlickove Brode*. – 1978. – Vol. 7. – P. 31–42.

62. Zadina, J. Inheritance of extreme intolerance to *Potato leafroll virus* / J. Zadina, F. Novak // *Genetika a Slechteni*. – UVTIZ. – 1983. – Vol. 19, № 3. – P. 189–194.

63. Swiezynski, K.M. Reaction to the *Potato leafroll virus* (PLRV) in diploid potatoes / K.M. Swiezynski, M.A. Dziewonska, K. Ostrowska, // *Potato Research*. – 1988. – Vol. 31. – P. 289–296.

64. Jayasinghe, U. Resistencia a los virus de la papa con especial énfasis en el virus del enrollamiento, de las hojas (PLRV) / U. Jayasinghe // *Avances en el Mejoramiento genético de la papa en los Países del Cono Sur* (Hidalgo O.A., Rincon H., eds.). – CIP, Lima, Perif. – 1990. – P. 121–132.

65. Трускинов, Э.В. Мировой генофонд картофеля ВИР: ретроспектива, реальные итоги и перспективы селекции на вирусоустойчивость / Э.В. Трускинов, Е.В. Рогозина // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. – 2007. – Т. 163. – С. 71–82.

66. Salazar, L.F. Virus Diseases of Potatoes / L.F. Salazar // *Encyclopedia of life sciences*. – John Wiley & Sons, Ltd. – 2006. – P. 1–8.

67. Heritability of field resistance to *Potato leafroll virus* in cultivated potato / C.R. Brown [et al.] // *Plant Breeding*. – 1997. – Vol. 116. – P. 585–88.

68. Taliany, M. *Potato leafroll virus*: a classic pathogen shows some new tricks / M. Taliany, M.A. Mayo, H. Barker // *Mol Plant Pathol*. – 2003. – Vol. 4, № 2. – P. 81–89.

69. Velasquez, A.C. Genetic characterization and mapping of major gene resistance to *Potato leafroll virus* in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* / A.C. Velasquez, E. Mihovilovich, M. Bonierbale // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2007. – Vol. 114. – P. 1051–1058.

70. Ross, H. Virusresistenzuechtung an der Kartoffel / H. Ross // *European Potato Journal*. – 1958. – Vol. 1. – P. 1–19.

71. Gillen, A.M. Molecular characterization of the progeny of *Solanum tuberosum* identifies a genomic region associated with resistance to *Potato leafroll virus* / A.M. Gillen, R.G. Novy // *Euphytica*. – 2007. – Vol. 155. – P. 403–415.

72. Kelley, K.B. Mapping of the *Potato leafroll virus* resistance gene, *Rlr_{etb}*, from *Solanum tuberosum* identifies interchromosomal translocations among its E-genome chromosomes 4 and 9 relative to the A-genome of *Solanum* L. sect. *Petota* / K.B. Kelley, J.L. Whitworth, R.G. Novy // *Molecular Breeding*. – 2009. – Vol. 23. – P. 489–500.

73. Johnson, R. Durable resistance: definition of, genetic control and attainment in plant breeding / R. Johnson // *Phytopathology*. – 1981. – Vol. 71. – P. 567–568.

74. Harrison, B.D. Virus variation in relation to resistance-breaking in plants / B.D. Harrison // *Euphytica*. – 2002. – Vol. 124. – P. 181–192.

75. The 25-kDa movement protein of PVX elicits *Nb* mediated hypersensitive cell death in potato / I. Malcuit [et al.] // *Molecular plant-microbe interactions*. – 1999. – Vol. 12. – P. 536–543.

76. Barker, H. Expression of genes for resistance to *Potato virus Y* in potato plants and protoplasts / H. Barker, B.D. Harrison // *Annals of Applied Biology*. – 1984. – Vol. 105. – P. 539–545.

77. The coat protein of Potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato / A. Bendahmane [et al.] // *The Plant Journal*. – 1995. – Vol. 8. – P. 933–941.

78. Hajimorad, M.R. Rsv1-mediated resistance against Soybean mosaic virus-N is hypersensitive response-independent at inoculation site, but has the potential to initiate a hypersensitive response-like mechanism /

M.R. Hajimorad, J.H. Hill // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2001. – Vol. 14. – P. 587–598.

79. Palloix, A. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies / A. Palloix, V. Ayme, B. Moury // *New Phytologist*. – 2009. – Vol. 183, № 1. – P. 190–199.

80. Potato virus Y NIa protease activity is not sufficient for elicitation of *Ry*-mediated disease resistance in potato / P. Mestre [et al.] // *Plant Journal*. – 2003. – Vol. 36. – P. 755–761.

Дата поступления статьи 4 марта 2013 г.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ХЛОРОТИЧЕСКОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ ЯБЛОНИ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
²РУП «Институт плодоводства»

Республика Беларусь, 223013, Минский район, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

Введение

Одной из важнейших проблем промышленного садоводства является распространение опасных заболеваний в садах интенсивного типа. Среди инфекций, имеющих важный экономический эффект, следует упомянуть заболевание вирусной этиологии. Опасной особенностью таких инфекций является часто встречающееся бессимптомное протекание. В то же время эти инфекции могут быть причиной значительных потерь урожая, вплоть до 60% от его общего количества в случае смешанных инфекций [1–3]. Этому благоприятствует способ размножения плодовых культур. Все культуры, являющиеся объектами коммерческого садоводства, размножаются вегетативно. Такой способ размножения, помимо своих очевидных преимуществ, может являться причиной прямого распространения вирусных инфекций, происходящего путем передачи вирусных частиц от зараженного материнского растения всем его потомкам. На сегодняшний день эффективные способы лечения вирусных инфекций растений отсутствуют. Основной мерой предотвращения появления вирусных инфекций в садовых насаждениях является размножение сертифицированного безвирусного материала. В качестве мероприятия, способствующего оздоровлению садовых насаждений, проводят санитарную вырубку инфицированных деревьев. Учитывая то, что садовые насаждения представлены древесными многолетними культурами и выращивание каждого отдельного растения от стадии саженца до взрослого плодоносящего растения требует значительных материальных и трудовых затрат, важность своевременного выявления зараженного материала сложно переоценить.

Стандарт международной организации ЕР-РО (European and Mediterranean Plant Protec-

tion Organization), членом которой является Республика Беларусь, предусматривает тестирование посадочного материала яблони, являющейся основным объектом промышленного садоводства в стране, на предмет заражения четырьмя вирусными инфекциями [4]. Одной из них является вирус хлоротической пятнистости листьев яблони, ACLSV (*Apple chlorotic leaf spot trichovirus*). Данный вирус способен инфицировать большинство плодовых деревьев семейства Розоцветных, включая яблоню, грушу, сливу, вишню, черешню, абрикос, персик, айву [2, 5, 6].

Основными методами диагностики вирусных инфекций растений являются:

- Использование деревьев-индикаторов. К недостаткам метода можно отнести большие временные затраты (по стандарту ЕР-РО для проведения методики требуется до пяти лет), дороговизну, сложность в интерпретации результатов [4, 7].
- Иммуноферментный анализ. Чаще всего для диагностики вирусов растений используют твердофазный гетерогенный иммунный анализ – ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Именно этот метод применяется для тестирования плодовых культур в Беларуси [8, 9]. Метод может давать ложноотрицательные результаты в случае низкого титра вирусных частиц, а также ингибирующего эффекта сока древесных растений. Использование метода имеет сезонные ограничения, связанные с изменением активности вируса в течение года [7, 10, 11].
- ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией). Наиболее современный метод диагностики. Характеризуется большей точностью результатов и наименьшими затратами времени. Ис-

пользуя кору деревьев, тестирование можно проводить круглый год [4, 7, 10, 11]. Преимущества метода обусловили его выбор для данного исследования в качестве

потенциальной методики тестирования садовых насаждений Республики Беларусь на предмет заражения вирусом хлоротической пятнистости яблони.

Материалы и методы

Исследования проводились на 14 сортах яблони, предоставленных РУП «Институт плодоводства». Образцы отбирали с каждого отдельного дерева.

Выделение РНК из растительного материала проводилось с помощью GeneJet™ Plant Genomic RNA Purification Mini Kit (Thermo scientific (EC)) согласно рекомендуемому протоколу. Для выделения РНК использовали фрагменты листовой пластинки. Синтез минус-цепи кДНК проводили с помощью RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific (EC)) согласно протоколу производителя. Для идентификации вируса использовали маркеры, описанные в методике [7]. Амплификацию кДНК проводили по методике [11] с модификациями. В реакции использовали внутренний контроль, а именно амплификацию растительной мРНК. Контрольную амплификацию проводили с помощью праймеров к созревшей мРНК гена, кодирующего субъединицу 5-НАДН-дегидрогеназы. Этот ген состоит из двух экзонов, а и b, разделенных интроном в 848 п.н. Дизайн этих праймеров был выполнен таким образом, чтобы последние три нуклеотида 3'-конца смыслового праймера были комплементарны первым трем нуклеотидам экзона b, а остальные нуклеотиды были комплементарны 5'-концу экзона a. Второй праймер полностью комплементарен экзону b. Это позволяет проводить контроль эксклюзивности амплификации РНК, поскольку последовательность смыслового праймера может использовать в качестве матрицы только РНК, прошедшую сплайсинг. Такой контроль позволяет избежать ложноотрицательных результатов, связанных с деградацией РНК или присутствием ингибиторов обратной транскриптазы [7]. В качестве отрицательного контроля матрицу кДНК в реакции

заменяли равным количеством деионизированной воды. Продукты амплификации разделяли в 1% агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания этидиум бромидом. В качестве маркера молекулярного веса использовали 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo scientific (EC)).

Для подтверждения принадлежности полученных фрагментов геному вируса ACLSV продукты амплификации одного из образцов после электрофоретического разделения вырезали из агарозного геля для последующего их выделения с использованием GeneJet™ Gel Extraction Kit (Thermo scientific (EC)). Выделенные фрагменты лигировались в плазмиду pTZ57R/T, которой трансформировали *E. coli* DH5α с помощью InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Thermo scientific (EC)) согласно рекомендациям производителя. После выращивания на LB-Amp среде из трансформантов выделяли плазмидную ДНК используя Plasmid GeneJet™ Miniprep Kit (Thermo scientific (EC)) согласно протоколу производителя. Фрагмент, встроенный в плазмидную ДНК, секвенировали с помощью праймеров к последовательности полилинкера вектора pTZ57R/T M13F (GTA-AAACGACGGCCAGT) и M13 R (CAGGAAA-CAGCTATGAC). Для проведения реакции использовали BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Амплификацию для секвенирования и очистку полученных продуктов амплификации проводили в соответствии с методикой производителя. Компьютерный анализ полученной нуклеотидной последовательности выполняли с помощью программного обеспечения, предоставленного на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и программы Geneious 4.7.6.

Результаты и обсуждение

Вирус хлоротической пятнистости листьев яблони содержит однонитевую плюс-цепь РНК, окруженную множеством копий белка капсида (CP, coat protein), имеющего молекулярную

массу 22 кДа [12]. Размер изученных геномов вируса (без учета поли(А)-хвоста на 3'-конце) колеблется от 7474 до 7561 п.о. [6, 13–18]. Геном ACLSV содержит три перекрывающиеся

открытые рамки считывания (ORFs 1, 2 и 3). ORF 1 кодирует белок, ассоциированный с репликацией – Rep, имеющий молекулярную массу 216 кДа. ORF 2 кодирует транспортный белок MP (moving protein), ORF 3 кодирует вышеупомянутый белок CP. Идентификация вируса ACLSV в представленном исследовании проводилась при помощи молекулярного маркера, амплифицирующего фрагмент вирусного генома, кодирующего белок CP. Наличие вируса

подтверждалось присутствием фрагмента амплификации длиной 677 п.о.

Тестированию были подвергнуты 32 образца яблони. С помощью ОТ-ПЦР вирус хлоротической пятнистости листьев яблони был идентифицирован в 24 образцах из 32. Результаты представлены в таблице. Вирус был обнаружен у 11 сортов яблони из 14 исследованных. У образцов сортов Ауксис, Надзейны и Чаравница вирус не был детектирован.

Результат тестирования яблонь на зараженность вирусом хлоротической пятнистости яблони методом ОТ-ПЦР

№	Название сорта	Наличие ACLSV по результатам ОТ-ПЦР
1	Антей	+
2		+
3	Антоновка Белсад	+
4		+
5	Ауксис	–
6		–
7	Вербнае	+
8		+
9	Дьямент	+
10		+
11	Заславское	+
12		+
13	Красавіта	+
14		+
15		+
16		+
17	Лучезарное	+
18		+
19	Мечта	+
20		–
21	Надзейны	–
22		–
23	Сакавіта	–
24		+
25	Сябрына	+
26		+
27		+
28		+

Продолжение табл.

№	Название сорта	Наличие ACLSV по результатам ОТ-ПЦР
29	Топаз	+
30		+
31	Чаравница	–
32		–

Соответствие фрагмента амплификации, полученного при помощи ОТ-ПЦР, тестируемому вирусу ACLSV было подтверждено секвенированием. В качестве объекта для секвенирования был взят фрагмент амплификации образца сорта яблони Сакавіта. Всего было выполнено 4 прочтения нуклеотидной последовательности данного фрагмента из двух клонов. Размер секвенированной последовательности соответствовал ожидаемому – 677 нуклеотидов. Нуклеотидная последовательность фрагмента генома вируса ACLSV белорусского изолята, получившая название Сакавіта-1, была опубликована в GenBank (National Center for Biotechnology Information) (номер доступа KC244768).

Нуклеотидная последовательность Сакавіта-1 сравнивалась с аннотированными нуклеотидными последовательностями, опубликованными в GenBank. Анализ подтвердил, что она представляет собой фрагмент гена оболочки вируса ACLSV и последующий 3'-нетранслируемый регион. Сравнение фрагмента Сакавіта-1 показало идентичность изучаемой последовательности в пределах 87–94 % при 100% перекрытии сравниваемых областей с выборкой отдельных известных нуклеотидных последовательностей вируса ACLSV. В частности, 94% идентичности было отмечено между Сакавіта-1 и фрагментами генома вирусов из Италии, Китая, Японии (номер доступа в GenBank AJ586624.1, GQ334204.1, AB326224.1 соответственно). Следует отметить, что для геномов вируса ACLSV характерна достаточно высокая дивергенция нуклеотидных последовательностей. Идентичность секвенированных на сегодняшний день геномов находится в пределах 67,2–95,1%. Различия в нуклеотидных последовательностях генома могут наблюдаться даже в случаях выделения вирусного материала из одного и того же растения. Описан случай заражения дерева смесью трех вариантов вируса ACLSV, между которыми наблюдалась

значительная степень дивергенции [5]. Помимо этого, для вируса хлоротической пятнистости листьев яблони характерны различия в степени дивергенции областей непосредственно внутри генома вируса. Результаты множественного выравнивания отдельных рамок считывания показали, что последовательность генома вируса, кодирующая белок CP, является наиболее консервативной, в то время как последовательность, кодирующая MP, – наименее консервативна [15]. Это необходимо учитывать при выборе области генома, которая будет амплифицироваться в процессе тестирования растений на присутствие вируса хлоротической пятнистости листьев яблони. В случае попадания праймеров на области с более высокой степенью дивергенции возрастает вероятность получения ложноотрицательных результатов тестирования. Примененные в представленном исследовании праймеры амплифицируют участок генома вируса, кодирующий относительно консервативный белок CP. Использование наименее вариабельной области генома вируса повышает точность получаемых результатов.

Компьютерная трансляция нуклеотидной последовательности Сакавіта-1 в аминокислотную и последующее выравнивание предполагаемой аминокислотной последовательности с депонированными в GenBank аминокислотными последовательностями белка оболочки ACLSV (номера доступа в GenBank BAF64461.1, BAF64464.1, BAF64467.1, AAA42589.1, AAA42589.1, CAA68083.1, BAA03643.1, CAB46654.1, NP_040553.1) показали наличие между ними замен отдельных аминокислот. Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей представлены на рисунке. Как видно из иллюстрации, замены отдельных аминокислот встречаются у разных изолятов ACLSV. Возможное влияние таких замен на функциональную активность белка представляет определенный интерес.

Считается, что белки капсида вирусов растений имеют множество функций. Помимо непосредственного формирования вирусных частиц, их участие было показано в репликации вирусных нуклеиновых кислот, перемещении вирусных частиц от одной клетки к другой, формировании симптомов, супрессии РНК-сайленсинга, системном распространении вируса [19, 20]. Было показано, что вирус мозаики люцерны (AMV) и его РНК не способны инфицировать растение при инокуляции в случае отсутствия в инокуляте нескольких молекул белка капсида или соответствующего транскрипта [21–23]. Белок СР вируса

хлоротической пятнистости листьев яблони принимает участие в репликации вирусного генома в клетке, что было доказано экспериментально [17]. Для эффективной репликации критическими оказались комбинации аминокислот в позициях 40 и 75 данного белка. Функционально активному белку соответствуют комбинации аминокислот либо аланин⁴⁰ + фенилаланин⁷⁵, либо серин⁴⁰ + тирозин⁷⁵ [17]. Аминокислоты гипотетического белка СР фрагмента вируса Сакавіта-1, находящиеся в позициях 40 и 75, представлены серином и тирозином соответственно, что говорит о возможной его функциональной активности.

Заключение

Метод ОТ-ПЦР, примененный в данном исследовании для тестирования сортов яблони на наличие ACLSV, позволил обнаружить вирус у 11 из 14 исследованных сортов. Из яблони сорта Сакавіта был выделен и секвенирован фрагмент генома вируса ACLSV. Данная последовательность представляет собой фрагмент гена вируса, кодирующего капсидный белок и последующий 3'-нетранслируемый

регион. Идентичность клонированной нуклеотидной последовательности отдельным последовательностям данной области генома вируса, представленным в базе данных GenBank, находится в пределах 87–94 %. Метод может быть использован для выявления распространения вируса хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV) в плодовых насаждениях.

Список используемых источников

1. Campbell, A.I. The effect of some latent virus infections of the growth and cropping apples / A.I. Campbell // *Journal of Horticultural Sciences*. – 1963. – Vol. 38. – P. 15–19.
2. Posnett, A.F. The effect of virus infection on the growth and crop of apple, pear and plum trees / A.F. Posnett, R. Cropley, C.E. Ellenberger // *Phytopathologia Mediterranea*. – 1963. – Vol. 2, № 158–161.
3. Schmidt, H. The effect of 'latent' virus infections on the yield of maiden trees on 20 apomictic apple seedling root-stocks / H. Schmidt // *Journal of Horticultural Sciences*. – 1972. – Vol. 47. – P. 159–163.
4. EPPO Standards – Certification schemes – PM 4/27(1) Pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia* // *EPPO Bulletin*. – 1999. – Vol. 29, № 3. – P. 239–252.
5. An immuno-capture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leaf spot virus / T. Candresse [et al.] // *Acta Horticulturae*. – 1995. – Vol. 386. – P. 136–147.
6. Complete nucleotide sequence of the genome of a serve cherry isolate of Apple chlorotic leaf spot tricho virus (ACLSV) / S. German [et al.] // *Archives of Virology*. – 1997. – Vol. 142. – P. 833–841.
7. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control / W. Menzel, W. Jelkmann, E. Maiss // *Journal of Virological Methods*. – 2002. – Vol. 99. – P. 81–92.
8. Положение о производстве посадочного материала плодовых и ягодных культур в Республике Беларусь / В.А. Самусь, Н.В. Кухарчик // РУП «Институт пловодства». – 2009. – С. 35.
9. Кухарчик, Н.В. Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси / Н.В. Кухарчик. – Минск: Беларуская навука, 2012. – 210 с.
10. Detection of four apple viruses by ELISA and RT-PCR assays in Turkey / K. Caglayan [et al.] // *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. – 2006. – Vol. 30. – P. 241–246.
11. Hassan, M. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-

- tube pentaplex RT-PCR / M. Hassan, A. Myrta, J. Polak // *Journal of Virological Methods*. – 2006. – Vol. 133. – P. 124–129.
12. Yoshikawa, N. Properties of RNAs and proteins of Apple stem grooving and Apple chlorotic leaf spot viruses / N. Yoshikawa, T. Takahashi // *Journal of General Virology*. – 1998. – Vol. 88. – P. 2611–2618.
13. Jelkmann, W. The nucleotide sequence of a strain of Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) responsible for plum pseudopox and its relation to an apple and plum bark split strain / W. Jelkmann // *Phytopathology*. – 1996. – Vol. 86. – P. 101.
14. Marini, D.B. The complete nucleotide sequence of an isolate of Apple chlorotic leaf spot virus from peach (*Prunica persica* (L.) Batch) / D.B. Marini, B.G. Gibson, S.W. Scott // *Archives of Virology*. – 2008. – Vol. 153. – P. 1003–1005.
15. Complete nucleotide sequences of the genomes of two isolates of apple chlorotic leaf spot virus from peach (*Prunus persica*) in China / F. Niu [et al.] // *Archives of Virology*. – 2012. – Vol. 157. – P. 783–786.
16. Sato, K. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of Apple chlorotic leaf spot virus / K. Sato, N. Yoshikawa, T. Takahashi // *Journal of General Virology*. – 1993. – Vol. 74. – P. 1927–1931.
17. Combinations of two amino acids (Ala⁴⁰ and Phe⁷⁵ or Ser⁴⁰ and Tyr⁷⁵) in the coat protein of Apple chlorotic leaf spot virus are crucial for infectivity / H. Yaegashi [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2007. – Vol. 88. – P. 2611–2618.
18. Nucleotide sequence and genomic organization of Apple chlorotic leaf spot closterovirus / S. German [et al.] // *Virology*. – 1990. – Vol. 179. – P. 104–112.
19. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses / A. Callaway [et al.] // *Annual Review of Phytopathology*. – 2001. – Vol. 39. – P. 419–460.
20. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome / R. Lu [et al.] // *PNAS*. – 2004. – Vol. 101. – P. 15 742–15 747.
21. Bol, J.F. Alfalfa mosaic virus and ilaviruses: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle / J.F. Bol // *Journal of General Virology*. – 1999. – Vol. 80. – P. 1089–1102.
22. Bol, J.F. Alfalfa mosaic virus: coat protein-dependent initiation of infection / J.F. Bol // *Molecular Plant Pathology*. – 2003. – Vol. 4. – P. 1–8.
23. Jaspars, E.M. Genome activation in alfalfa- and ilaviruses / E.M. Jaspars // *Archives of Virology*. – 1999. – Vol. 144. – P. 843–863.

Дата поступления статьи 11 июня 2013 г.

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *TNF- α* ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

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

Введение

Злокачественные новообразования в Республике Беларусь являются причиной смерти в 13,7% случаев, занимая второе место (после болезней системы кровообращения) в структуре общей смертности населения и первичной инвалидности. При этом среди всех первично выявленных онкологических пациентов число больных онкоурологического профиля с 2006 по 2010 гг. возросло на 31%. В структуре онкологической патологии опухоли мочевого пузыря составляют около 4%, а среди онкоурологических заболеваний – примерно 40%. В последние годы отмечается непрерывный рост заболеваемости раком мочевого пузыря. В Республике Беларусь ежегодно выявляется более 1000 вновь заболевших [1–3]. В связи с этим проблема диагностики и лечения злокачественных новообразований выходит в разряд ведущих медико-социальных проблем.

Специфическими опухолевыми маркерами, помогающими выявить злокачественный рост в мочевом пузыре, а также необходимыми при диагностике и мониторинге заболевания, являются: *Cyfra 21–1* (фрагмент цитокератина 19), тканевый полипептидный антиген (ТПА) и тканевый полипептидный специфический антиген (ТПСА). Например, при карциноме мочевого пузыря наблюдается четкая корреляция между степенью распространенности заболевания, наличием или отсутствием метастазов, а также эффективностью лечения и изменением содержания этих опухолевых маркеров в крови. В настоящее время активно изучается эффективность использования целого ряда неспецифических и специфических маркеров для диагностики рецидивов РМП: онкогенов, факторов опухолевого ангиогенеза и ингибиторов ангиогенеза, белков-регуляторов клеточного цикла, антигенов клеточной пролиферации, рецепторов эпидермального фактора роста, пептидных факторов роста [4]. Одновременно с этим во всем мире ведется актив-

ный поиск так называемых генов-кандидатов, для которых доказана роль кодируемых ими белков в возникновении и развитии определенного заболевания.

Большой интерес для исследователей в этом плане представляет ген *TNF- α* (*tumor necrosis factor*), кодирующий фактор некроза опухолей- α (*TNF- α*). Фактор некроза опухолей (*TNF- α*) – белок с молекулярной массой 17 кДа – синтезируется моноцитами/макрофагами, нейтрофилами, Т-лимфоцитами и обладает широким спектром биологического действия. Этот цитокин играет ключевую роль в развитии воспалительного ответа: инициирует синтез интерлейкинов, активирует макрофаги, стимулирует пролиферацию Т- и В-лимфоцитов. Системное действие *TNF* связано с тем, что все клетки организма обладают рецепторами к этому фактору, при высокой концентрации которого развиваются различные эффекты: активация нейтрофилов, расстройства липидного и углеводного обмена, метаболический ацидоз, анорексия, кахексия, шоковое состояние, падение кровяного давления, вплоть до гибели организма. Он обладает цитотоксическим действием, иммуномодулирующим и провоспалительным эффектом, участвует в противовирусном, противоопухолевом и трансплантационном иммунитете [5]. *TNF- α* способен индуцировать гибель клеток путем апоптоза, запускать каскад воспалительных реакций, ингибировать канцерогенез и репликацию вирусов.

Ген *TNF- α* расположен на шестой хромосоме (6p21.3) в локусе, кодирующем молекулы главного комплекса гистосовместимости. Известны более 30 полиморфных вариантов гена, но только около половины из них влияют на экспрессию *TNF- α* *in vitro*. Промоторная зона гена *TNF- α* включает восемь полиморфных участков с единичными нуклеотидными заменами: -1031 T/C, -863 C/A, -857 C/T, -575 G/A, -376 G/A, -308 G/A, -244 G/A, -238 G/A.

Однако, наиболее значимыми для человека считаются два. Это единичные нуклеотидные замены гуанина на аденин в положениях: -308 и -238, которые вызывают изменения уровня продукции *TNF-α*, т.е. являются функциональными [5–8]. Позиции -308 и -238 приходятся на промотор, что сказывается на возможности транскрипционных факторов связываться с этой частью гена и, таким образом, влиять на скорость транскрипции [9]. Наибольший интерес исследователей вызывает полиморфизм -308 G/A. Fernandez H. и соавт. (2002) измерили продукцию *TNF-α* мононуклеарами периферической крови человека, стимулированными конканавалином А, и показали, что клетки доноров, гомозиготных по полиморфному аллелю -308 А, синтезируют цитокин в 3 раза активнее, чем клетки лиц с генотипом

-308 GG [10]. В результате было показано, что нуклеотидная замена гуанина на аденин в позиции -308 значительно повышает транскрипционную активность и увеличивает скорость образования мРНК.

В различных популяциях частота мутантного аллеля -308 А гена *TNF-α* варьирует, по данным разных авторов, от 8 до 27%: так, частота минорного аллеля -308 А гена *TNF-α* составляет 9% для азиатов, 16–18% для европеоидного населения и до 24% для жителей Австралии [11–14].

Целью данного исследования было изучить распределение частот аллельных вариантов и полиморфных генотипов в положении -308 промотора гена *TNF-α* у здоровых лиц и пациентов с установленным диагнозом рак мочевого пузыря (РМП) в Республике Беларусь.

Материалы и методы

Объекты исследования – лимфоциты периферической крови человека и геномная ДНК. Выделение ДНК из образцов цельной венозной крови осуществлялось методом фенол-хлороформной экстракции.

Группы обследования. Всего было обследовано 200 человек – жителей Республики Беларусь. Контрольную группу ($n = 100$) составили: 1) здоровые добровольцы, обратившиеся в ГУ РНПЦ гематологии и трансфузиологии для сдачи донорской крови; 2) лица без выявленной онкологической патологии, находящиеся на обследовании в ГУ «Республиканский клинический госпиталь инвалидов Великой Отечественной войны имени П.М. Машерова» (группа пациентов кафедры геронтологии и гериатрии БелМАПО). Основанием для включения в контрольную группу являлось отсутствие острых и хронических воспалительных заболеваний (особенно мочеполовой системы), отсутствие острых респираторных заболеваний; обязательным условием включения в контрольную группу было также оформление: 1) Информированного согласия на участие в обследовании; 2) Памятки добровольного участника, разъясняющей его права и цель исследования; 3) Анкеты участника, которая содержит сведения о возрасте, адресе проживания, вредных привычках, перенесенных заболеваниях, приеме лекарств, рентгенологическом обследовании, месте и стаже работы, вредных условиях труда.

Группа пациентов ($n = 100$) состояла из лиц, находящихся на лечении в ГУ РНПЦ онкологии и радиационной медицины им. Н.Н. Александрова (г. Минск) в отделении онкоурологической патологии. Диагноз «рак мочевого пузыря» устанавливался при клинико-инструментальном обследовании пациентов и подтверждался результатами гистологического исследования опухоли.

Отбор биологического материала (периферической венозной крови) проводился сотрудниками медицинских учреждений после подписания участниками исследования информированного согласия. Стерильно взятые образцы цельной крови в количестве 3–5 мл хранились в вакуутайнерах с распыленным ЭДТА при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до начала лабораторных исследований.

Молекулярно-генетическое исследование. Типирование аллелей гена *TNF-α* проводили методом ПЦР-ПДРФ (полимеразной цепной реакции с анализом полиморфизма длин рестриционных фрагментов). Для идентификации полиморфизма использованы следующие локуспецифические олиго-нуклеотидные праймеры [15]: (F) 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3', (R) 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'.

ПЦР проводили в конечном объеме 15 мкл, содержащем 100 ng ДНК, 2 mM dNTPs, 20 pmol каждого праймера, 1,5 mM MgCl₂, 1x PCR буфер, 1,25 U Taq DNA полимеразы в соответствии с температурными условиями, описанными в работе Wilson A.G. [15].

Продукты амплификации обрабатывали специфической рестриктазой *Nco I* (при 37 °С в течение 18 ч). Продукты рестрикции фракционировали в 8%-м неденатурирующем полиакриламидном геле при напряжении 150 В в течение 3 ч. Фрагменты ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете. Интерпретация результатов генотипирования: наличие двух фрагментов ДНК длиной

87 и 20 п.о. позволяет сделать вывод о гомозиготном диком типе -308 G/G, наличие одного фрагмента длиной 107 п.о. – о гомозиготном мутантном типе -308 A/A. Наличие трех фрагментов ДНК свидетельствует о гетерозиготности по изучаемому локусу.

Пример электрофоретического разделения фрагментов ДНК представлен на рисунке.

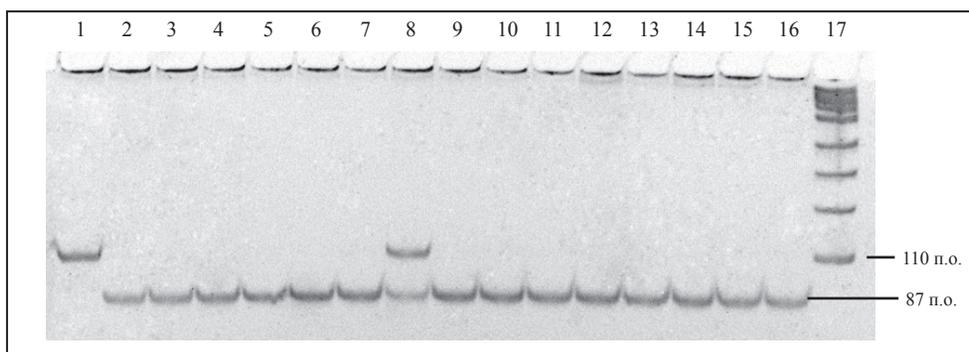


Рис. Пример электрофореграммы типирования гена *TNF-α* (дорожка 17 – маркер молекулярного веса; дорожка 1 – генотип -308 A/A, дорожка 8 – генотип -308 G/A; дорожки 2–7 и 9–16 – генотип -308 G/G, (на данной фореграмме не отображен фрагмент длиной 20 п.о.))

Статистические методы. Проверку соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга и сравнение частот аллелей

между выборками выполняли с помощью критерия χ^2 . Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$ [16].

Результаты и обсуждение

Сведения по полу, возрасту и статусу курения в

обследованных группах представлены в табл. 1.

Таблица 1

Общая характеристика групп обследования

Выборка	Возраст (лет)	Пол, %		Курение, %		
		Жен	Муж	Да	Нет	Нет сведений
Контроль (n = 100)	56,20 ± 1,02	32	68	35	42	23
РМП (n = 100)	66,33 ± 1,01	24	76	57	38	5

Видно, что в группах обследования более 60% исследуемых лиц – мужчины; средний возраст обследуемых 56 лет в контроле и 66 лет в группе пациентов; курящие составляют 35 и 57%, соответственно.

Результаты генотипирования образцов ДНК. Анализ полиморфизма -308 G/A гена *TNF-α* не выявил отклонения распределений генотипов от ожидаемых при равновесии Харди-Вайнберга в обследуемых группах ($\chi^2 =$

0,37 у больных и $\chi^2 = 1,69$ в контрольной группе, соответственно).

Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что статистически значимых различий в распределении частот генотипов и аллелей на данных объемах выборок между группами не выявлено, свидетельствуя о необходимости расширить исследования. Следует отметить, что редкий генотип A/A встретился только в группе пациентов.

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма -308 G/A гена *TNF-α*

Генотип/аллель	Частота генотипа/аллеля	
	Контроль (<i>n</i> = 100)	РМП (<i>n</i> = 100)
<i>GG</i>	77	75
<i>GA</i>	23	24
<i>AA</i>	0	1
<i>A</i>	11,5	13,0
<i>G</i>	88,5	87,0

Примечание: наблюдаемые различия в частоте аллелей между группами статистически не значимы ($\chi^2 = 0,209$ при $P = 0,647$).

Известно, что наличие аллельного варианта -308 *A* увеличивает риск развития таких заболеваний как бронхиальная астма, псориаз, метаболический синдром, сахарный диабет 1 типа, некоторых онкологических заболеваний, обуславливает худший ответ на стероидную терапию при болезни Крона и язвенном колите, а также на блокаторы фактора некроза опухолей при лечении ревматоидного артрита [17–18]. Наличие в генотипе высокопродуцирующего полиморфного аллеля -308 *A* обуславливает увеличение скорости синтеза цитокина, его концентрация в сыворотке крови повышается, что приводит к активации местных воспалительных реакций и нарушению регуляции многих процессов (секреции интерлейкина 1, контроля пролиферации и дифференцировки клеток, апоптоза, метаболизма липидов, свертывания крови, устойчивости к действию инсулина) [10].

Отсутствие статистически значимой ассоциации исследованного полиморфизма -308 G/A гена *TNF-α* с РМП на данном этапе исследования не исключает возможной вовлеченности данного аллельного варианта в формирование особенностей течения этого заболевания, а также его связь с на-

личием и сроками появления осложнений. В ряде работ приведены данные, свидетельствующие о связи генотипа -308 G/A со стадией развития РМП и дифференцировки опухоли. Также продемонстрировано, что *TNF-α* -308 (*AA+GA*) генотипы могут быть маркером мышечно-инвазивного рака [19–21]. Приведенное обсуждение говорит о целесообразности продолжения исследований.

Результаты генотипирования образцов ДНК с учетом фактора курения. Известно, что курение является важнейшим этиологическим фактором в возникновении и развитии рака мочевого пузыря. Посредством курения в организм попадает целый ряд канцерогенных веществ. На сегодняшний день среди больных раком мочевого пузыря мужчины-курильщики составляют более 90%. Более чем в 6 раз увеличивается риск развития рака при выкуривании 10 и более сигарет в сутки. Для курильщиков риск возникновения РМП увеличивается от 3 до 5 раз по сравнению с некурящими [22–23].

В связи с этим, сделана попытка проанализировать частоты генотипов/аллелей -308 G/A гена *TNF-α* в обследованных выборках с учетом фактора курения (табл. 3).

Таблица 3

Распределение частот генотипов/аллелей в группах обследования с учетом статуса курения

Генотип/аллель	Частота генотипа/аллеля, <i>n</i> (%)			χ^2
	Контроль курящие (<i>n</i> = 35)	РМП курящие (<i>n</i> = 57)	РМП некурящие (<i>n</i> = 38)	
<i>GG</i>	27 (77,14)	41 (71,93)	29 (76,32)	0,448*, $P = 0,5031$
<i>GA</i>	8 (22,86)	15 (26,32)	9 (23,68)	
<i>AA</i>	0 (0)	1 (1,75)	0 (0)	
<i>G</i>	62 (88,57)	97 (85,09)	67 (88,16)	0,363**, $P = 0,5463$
<i>A</i>	8 (11,43)	17 (14,91)	9 (11,84)	

* – значение χ^2 при сравнении групп «контроль курящие и РМП курящие»; ** – значение χ^2 при сравнении групп «РМП курящие и РМП некурящие».

Как видно из таблицы, у курящих пациентов с РМП частота минорного (высокопродукующего) аллеля *A* и гетерозиготного генотипа *G/A* лишь незначительно выше (соответственно на 3,48 и 3,46%) по сравнению с курящими лицами из контроля и некурящими лицами с РМП (статистической значимости нет). Согласно приве-

денному литературному обзору можно было бы предположить, что у курящих лиц с РМП аллель *A* и генотип *G/A* могут выступать как генетический фактор, повышающий риск развития РМП, но для подтверждения этого предположения необходимы исследования на расширенных выборках пациентов и контрольных лиц.

Заключение

Проанализированы равноценные выборки пациентов с гистологически установленным РМП и контрольных лиц по полиморфизму -308 *G/A* гена *TNF-α*, кодирующего фактор некроза опухолей- α , провоспалительный цитокин, который участвует в контроле пролиферации и дифференцировки клеток, апоптоза, метаболизма липидов, свертывания крови, активирует воспалительный ответ организма.

В обследуемых группах не выявлено отклонения распределений генотипов от ожидаемых при равновесии Харди-Вайнберга. Распределение частот аллелей и генотипов исследуемого полиморфизма у представителей здорового населения Беларуси соответствует данным по европеоидным популяциям.

Не выявлено статистически значимых различий между частотами изученных генотипов/аллелей в выборках пациентов с РМП и лиц без онкопатологии. При сравнении частот генотипов в выборках с учетом фактора курения также не обнаружено достоверных различий.

Автор выражает признательность за сотрудничество в рамках выполнения задания 2.12 ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий» (подпрограмма «Геномика») д-ру мед. наук, профессору Красному С.А.; зав. отделом онкоурологической патологии, к. мед. наук Полякову С.Л.; вед. научному сотруднику, к. мед. наук Ролевичу А.И. из ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (г. Минск).

Список используемых источников

1. Динамика злокачественных новообразований онкоурологического профиля в Республике Беларусь / О.Г. Суконко [и др.] / Взаимодействие белорусских и литовских организаций в сфере нано- и биотехнологий, оптики, машиностроения, медицины: научно-практический семинар, 2011 г. – [Электронный ресурс] // Репозиторий БНТУ. – Режим доступа: <http://rep.bntu.by/handle/data/2463>.

2. Злокачественные новообразования в Беларуси, 2001–2011 / С.М. Поляков [и др.]; под ред. М.М. Сачек, О.Г. Суконко. – Минск: РНПЦ МТ, 2011. – 205 с.

3. Внутрипузырная химио- и иммунотерапия поверхностного рака мочевого пузыря / С.А. Красный [и др.] // Медицинские новости. – 2003. – № 2. – С. 12–19.

4. Диагностика инвазивного рака мочевого пузыря по лабораторным показателям: инструкция по применению / В.И. Прохорова [и др.]; утв. Министерством здравоохранения РБ 13.05.2005. – Минск, 2005. – 16 с.

5. Qidwai, T. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence / T. Qidwai, F. Khan // Scand. J. Immunol. – 2011. – Vol. 74, № 6. – P. 522–547.

6. Королева, Ж.В. Роль полиморфных генетических маркеров ACE(I/D), GSTT1, GSTM1, TNF и ожирения в патогенезе неуточненной инфекции подкожно-жировой клетчатки / Ж.В. Королева, С.В. Подольская // Дерматология та венерология. – 2010. – № 1 (47). – С. 47–53.

7. Рыдловская, А.В. Функциональный полиморфизм гена *TNF-α* и патология / А.В. Рыдловская, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 4–10.

8. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization / G.E. Nedwin [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1985. – Vol. 13, № 17. – P. 6361–6373.

9. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic mark-

- ers / I.A. Udalova [et al.] // *Genomics*. – 1993. – Vol. 16. – P. 180–186.
10. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplantant patients / H. Fernandes [et al.] // *Transplantation*. – 2002. – Vol. 73, № 12. – P. 1886–1891.
11. Meta-analysis of TNF 308 G/A polymorphism and type 2 diabetes mellitus / R.N. Feng [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Apr 8;6(4):e18480. doi: 10.1371.
12. Excessive fat accumulation is associated with the TNF α -308 G/A promoter polymorphism in women but not in men / J. Hoffstedt [et al.] // *Diabetologia*. – 2000. – Vol. 43, Issue 1. – P. 117–120.
13. Tumor necrosis factor- α -308 GA polymorphism in obese Caucasians / E. Brand [et al.] // *International Journal of Obesity*. – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 581–585.
14. -308 Nco I polymorphism of tumour necrosis factor alpha in overweight Caucasians / A.M. Morris [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2003. – Vol. 62, № 3. – P. 197–201.
15. Single base gene polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF detectable by NcoI restriction of PCR product) / A.G. Wilson [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1992. – Vol. 1, № 5. – P. 353.
16. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М., МедиаСфера, 2002. – 312 с.
17. Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) promoter gene and response to TNF- α inhibitors in Spanish patients with inflammatory bowel disease / R. López-Hernández [et al.] // *J. Immunogenet.* – 2013. – Apr 17. doi: 10.1111/iji.12059.
18. The -308G/A polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha gene is associated with the risk of upper aerodigestive tract cancer: a meta-analysis / J. Wang [et al.] // *Tohoku J Exp Med.* – 2013. – Vol. 229, № 4. – P.245–254.
19. Bladder Cancer Working Group Report / Y. Kakehi [et al.] // *Japanese Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 40, Issue suppl. 1. – P. i57–i64.
20. Meta-analysis shows strong positive association of the TNF- α gene with tumor stage in bladder cancer / Z. Yang [et al.] // *Urol. Int.* – 2012. – Vol. 89, № 3. – P. 337–341.
21. Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation / H.P. Marsh [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 89, № 6. – P. 1096–1101.
22. A Case–Control Study of Smoking and Bladder Cancer Risk: Emergent Patterns Over Time / D. Baris [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2009. – Vol. 101, № 22. – P. 1553–1561.
23. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women / N.D. Freedman [et al.] // *JAMA.* – 2011. – Vol. 306, № 7. – P. 737–745.

Дата поступления статьи 26 июня 2013 г

МЕЙОТИЧЕСКОЕ УДВОЕНИЕ ХРОМОСОМ В СЕЛЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОТБОРА НА ДИПЛОИДНОМ УРОВНЕ (обзорная статья)

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

Введение

Одним из наиболее перспективных направлений оптимизации селекционного процесса картофеля является разработка подходов к использованию отбора на диплоидном уровне. Эта технология включает следующие этапы: 1) получение дигаплоидов *S. tuberosum*; 2) скрещивание их с дикими видами – потенциальными донорами ценных генов; 3) беккроссирование, самоопыление, гибридизация полученных гибридов между собой и отбор с целью комбинации и концентрации желательных генов и элиминации нежелательных; 4) перевод отобранных генотипов на тетраплоидный уровень с помощью мейотического удвоения хромосом [1, 2].

Названное направление имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционной селекцией картофеля. Благодаря более простому наследованию хозяйственно-ценных признаков на диплоидном уровне значительно проще отбирать гибриды с комплексом желаемых признаков, чем на тетраплоидном уровне. Требуется меньший объем популяции для выделения сложных рекомбинантов, отвечающих запросам селекции. Аккумуляция желаемых и элиминация нежелательных генов быстрее происходит на диплоидном уровне, чем на тетраплоидном. Создание мультиплексных родительских линий с комплексом генов устойчивости к болезням и вредителям с помощью отбора на диплоидном уровне намного эффективнее, чем на тетраплоидном. Дигаплоиды культурного картофеля *S. tuberosum* относительно легко скрещиваются со многими диплоидными дикими видами картофеля,

что дает возможность расширить генетическое разнообразие селекционного материала, привлекать ценные гены диких видов.

Мейотическое удвоение хромосом для перевода исходного материала на тетраплоидный уровень обеспечивает сохранение значительной доли гетерозиготности, дает возможность получать более выровненные, продуктивные, экологически стабильные тетраплоидные гибридные популяции, практически не расщепляющиеся по комплексу признаков, сформированному на диплоидном уровне. FDR 2n пыльца дигаплоидов более гетерозиготна и более гомогенна, чем n-пыльца тетраплоидных сортов. Вариация ошибки в 4х-2х семьях в 3 раза меньше, чем в соответствующих 4х-4х семьях [3]. Следовательно, для достижения определенного селекционного результата размер гибридной популяции может быть уменьшен в 3 раза.

В ходе развития рассматриваемого направления селекции картофеля подтверждены на практике его широкие возможности [4]. Однако, несмотря на имеющиеся достижения и безусловную перспективность, следует признать, что эта селекционная стратегия пока не получила широкого распространения, поскольку на практике не удается в полной мере реализовать ее преимущества. Это обусловлено наличием ряда проблем, связанных с биологией диплоидного картофеля, многие из которых до конца не решены.

Целью настоящей работы является анализ трудностей мейотического удвоения хромосом на завершающем этапе диплоидной селекции и рассмотрение подходов к их преодолению.

Мейотическое удвоение хромосом в селекции картофеля

В результате нарушений в ходе мейоза могут формироваться т.н. нередуцированные, или 2n-гаметы, которые имеют число хромо-

сом спорофита, а не гаметофита. 2n-гаметы, образовавшиеся в ходе микроспорогенеза, называют дипландроидами (2n-пыльца), а

в ходе мегаспорогенеза – диплоиноидами (2n-яйцеклетки) [5]. Известно несколько способов (нарушений мейоза) получения 2n-гамет. Для селекции картофеля с использованием отбора на диплоидном уровне наибольшее значение имеют FDR- и SDR-механизмы формирования 2n-гамет.

FDR (first division restitution) связывают с появлением слившихся (*fs*) [6] или параллельных (*ps*) [7] веретен деления в метафазе II. В результате формируются только два полюса с двумя группами хромосом. Мейоз заканчивается формированием только одной клеточной стенки (эквационного деления). Образуется диада 2n-микроспор. В лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси проведено специальное исследование вопроса о роли коориентации веретен в FDR [8–10]. Тщательное изучение корреляций между частотой *ps* и частотой диад у форм, продуцирующих и не продуцирующих 2n-пыльцу, применение математического моделирования позволило получить убедительные доказательства того, что «параллельные веретена» не являются нарушением мейоза, а образование диад связано с мутацией *fs*. В то же время полученные результаты не подтвердили предполагаемой в норме любой, чисто случайной [6] или только перпендикулярной [7] коориентации веретен в мейозе. Проведенный анализ распределения углов взаимного расположения веретен деления свидетельствует, что мейоциты разделяются на две равноценные группы с параллельной и перпендикулярной коориентацией. Отклонения носят случайный характер. Поэтому тетраэдр вторичных фрагмопластов может с равной вероятностью образовываться как из параллельных, так и перпендикулярных первичных фрагмопластов [8–10].

В основе SDR (second division restitution) лежит эндомитоз интерфазных ядер между первым и вторым делением мейоза и преждевременное образование клеточной пластинки редукционного деления. В этом случае метафаза, анафаза и телофаза второго деления отсутствуют. D.W.C. Mok, S.J. Peloquin [11] этот тип SDR назвали механизмом преждевременного цитокинеза (мутации *pc-1* и *pc-2*). J.E. Werner, S.J. Peloquin [12] указывают, что доминирующий механизм образова-

ния 2n-яйцеклеток – утрата второго деления мейоза. Он контролируется одним рецессивным геном (*os*). Другой механизм образования 2n-яйцеклеток – утрата цитокинеза после второго деления мейоза, который контролируется одним рецессивным геном (*fc*). Генетическая структура 2n-яйцеклеток формируется с помощью любого механизма SDR.

Мейотическая полиплоидизация может быть как односторонней (в интерплоидных скрещиваниях 4x-2x и 2x-4x), так и двусторонней (2x-2x). Имеется целый ряд публикаций, в которых обсуждается роль 2n-гамет в полиплоидизации и генетические последствия использования различных способов их формирования [13].

Основное различие между FDR и SDR заключается в том, что при FDR две хроматиды каждой хромосомы попадают в разные 2n-споры, что ведет к сохранению родительской гетерозиготности в сформировавшихся гаметах. При SDR хроматиды каждой хромосомы попадают в одну из 2n-спор, что приводит к увеличению гомозиготности. J.G.Th. Hermesen [14] рассчитал, что средний процент родительской гетерозиготности, представленной в FDR- и SDR-гаметах для четырех типов хромосом с известными сайтами центромер и кроссоверов, составляет, соответственно 80,2% и 39,6%. G.C.C. Tai [42] сравнил средние и дисперсии потомства шести типов скрещиваний (FDR × FDR; FDR × SDR; SDR × SDR; 4x × FDR; 4x × SDR; 4x × 4x), предположив, что в скрещивания взяты диаллельные родительские генотипы Aa и AAaa при различных типах гипотетических моделей (аддитивная, доминирование и сверхдоминирование). Средние и дисперсия FDR-потомства, как полагает автор, были больше и меньше, соответственно, чем у SDR-потомства в случае, когда локус располагался ближе к центромере. Ситуация менялась на противоположную при расположении локуса в области, близкой к концу длинного плеча хромосомы. «Эффект положения» гена у SDR-гамет, как оказалось, более сильный, чем у FDR-гамет. 2n-гаметы оказывают большее влияние на продуктивность потомства в 2x-2x скрещиваниях, чем в 4x-2x. Аналогичные результаты получены K.Watanabe et al. [15]. По их мнению, наиболее надежный способ достижения высокой степе-

ни гетерозиготности тетраплоидного потомства – это использование в двусторонней полиплоидизации скрещиваний типа $FDR \times SDR$.

Качественный признак наличия либо отсутствия слияния веретен в мейозе и формирования $2n$ пыльцы имеет количественный характер проявления (частота слияния веретен в мейозе, частота $2n$ пыльцы). Частота формирования $2n$ пыльцы у растений природных популяций картофеля и образцов селекционного материала варьирует в широких пределах – от долей процента до 100% [16]. Весьма существенна вариация формирования $2n$ пыльцы у гибридных популяций, причем она имеет непрерывный характер [17, 18]. Экспрессивность генов fs (частота $2n$ пыльцы) определяется генотипом исследуемых образцов, средовыми факторами и их взаимодействием [17, 19]. Вариация генотипов картофеля по частоте fs указывает на вероятное полигенное наследование данного признака или участие в его контроле полигенов. Впервые Е. Jacobsen [20], анализируя уровень скрещиваемости диплоидных гибридов в системе $4x \times 2x$ в зависимости от частоты формирования у них $2n$ пыльцы, пришел к заключению, что изучаемый показатель контролируется совместно главными рецессивными генами и полигенами. В 1980-х годах была предложена модель генетического контроля fs , где главные гены (ген) взаимодействуют с полигенами (генетическим фоном, модифицирующим экспрессию главных генов). Применяя методологию анализа количественных признаков, было показано, что частота формирования $2n$ пыльцы (вариация экспрессивности fs) определяется действием двух-четырёх локусов с равными эффектами [21].

Ж. Mooney, S.J. Peloquin [22] показали возможность повышения частоты $2n$ пыльцы, а F. Serquen, S.J. Peloquin [23] частоты $2n$ яйцеклеток с помощью рекуррентного отбора. В лаборатории генетики картофеля ИГиЦ НАН Беларуси с помощью такого отбора созданы диплоидные линии картофеля, формирующие 80–100% $2n$ пыльцы [24]. Эти линии в скрещиваниях с дигаплоидами, способными образовывать небольшое количество нередуцированной пыльцы, были способны давать потомство, значительная часть которого (30–80%) формировало диады с частотой 10% и

более (по нашим данным 10% диад – уровень, необходимый для успешного применения мейотического удвоения хромосом).

Наш опыт изучения генетического контроля формирования нередуцированной пыльцы при гибридизации дигаплоидов картофеля можно суммировать следующим образом.

1. При скрещивании дигаплоидов, не образующих $2n$ пыльцу, вероятность выщепления гибридов, способных формировать нередуцированную пыльцу, крайне низкая. При этом частота диад у гибридов, образующих нередуцированную пыльцу, как правило, невысокая (недостаточная для мейотического удвоения хромосом).

2. Скрещивания, в которых оба родителя образуют нередуцированную пыльцу, позволяют гарантированно получить гибриды, определенная доля которых с достаточной для мейотического удвоения частотой образует $2n$ пыльцу. Эта доля тем выше, чем выше частота нередуцированной пыльцы у каждого из родителей. Возможно получение гибридов, которые формируют $2n$ пыльцу с более высокой частотой, чем у лучшего по этому показателю родителя [24].

3. Гибридизация между дигаплоидами, один из которых образует $2n$ пыльцу с частотой 80–100% (донор генов этого признака), а второй не образует, не гарантирует получение потомства, способного формировать с достаточной для мейотического удвоения хромосом частотой нередуцированной пыльцы. Небольшое количество таких гибридов получается только в случае, если в родословной родителя с нормальным мейозом имелись генотипы, образующие $2n$ пыльцу [25].

Считается, что частота генотипов, формирующих нередуцированные гаметы, среди дигаплоидов и диплоидных видов картофеля достаточно велика для успешного использования мейотической полиплоидизации при переводе перспективного исходного диплоидного материала на тетраплоидный уровень [см. 26]. По нашим данным многолетнего изучения большой коллекции дигаплоидов картофеля разного происхождения, генотипы, образующие нередуцированную пыльцу, встречались с частотой 28,9%. Однако из 14 выделенных образцов, которые формировали более 5% нередуцированных пыльцевых зерен, лишь один обладал достаточно высокой функциональной фертильностью пыльцы (как

показывает наш опыт, 5% диад – минимальный уровень, необходимый для получения небольшого количества семян в 4х-2х скрещиваниях). То есть, лишь 7% от числа продуцентов 2n пыльцы обладали удовлетворительной мужской фертильностью, что составляет 0,8% от общего числа проанализированных форм [27].

Е. Jacobsen [28, 29] считает, что эффективность гибридизации в интерплоидных скрещиваниях является функцией двух переменных: частоты 2n-зерен в пыльце генотипа и их функциональной фертильности. Нами проведено специальное исследование сопряженности варьирования результатов гибридизации продуцентов 2n пыльцы с диплоидными и тетраплоидными тестерами [30]. Установлено, что стерильные формы или дигаплоиды с низкой функциональной фертильностью пыльцы в 2х-2х скрещиваниях являются, за редким исключением, низкофертильными и в скрещиваниях 4х-2х. Напротив, высоко фертильные при гибридизации на диплоидном уровне образцы с большой вероятностью (70% и более) обладали высокой опыляющей способностью и в скрещиваниях с тетраплоидными сортами.

Проблема фертильности диплоидного селекционного материала и пути ее решения

Первичные дигаплоиды сортов картофеля по степени гетерозиготности приблизительно эквивалентны третьему поколению от самоопыления тетраплоидного родителя [32]. Инбредная депрессия у них проявляется не только в снижении мощности и жизнеспособности растений, но и угнетении генеративной сферы. Так, по данным Gorea, среди 282 дигаплоидов, происходивших от 20 тетраплоидов, менее 10% формировали жизнеспособную (окрашивающуюся) пыльцу [33]. Rousselle-Bourgeois и Rousselle не обнаружили ни одного мужски фертильного образца среди более чем трех тысяч первичных дигаплоидов, полученных от 445 тетраплоидных клонов [34].

Дигаплоиды картофеля, даже формирующие какое-то количество неабортивной (жизнеспособной) пыльцы, далеко не всегда могут служить в скрещиваниях опылителями. Как показывает практика, оценка мужской фертильности по результатам завязываемости семян в пробных скрещиваниях часто не совпадает с уровнем жизнеспособности пыльцы. Обычно реальная

Многолетнее изучение большой коллекции дигаплоидов картофеля, прошедших первичный отбор по фертильности, показало, что около 10% способных к цветению форм не образовывали пыльцу вообще, 35% формировали ее в небольшом количестве (менее 0,5 мг/цветок). Функциональная фертильность пыльцы в целом была очень низкая: у 65% изученных форм она была ниже 5%, а у 5% образцов пыльца не проросла вообще. Следовательно, лишь 16,5% от общего количества проанализированных форм можно использовать в скрещиваниях в качестве опылителей [31]. Вероятность сочетания в одном генотипе способности формировать нередуцированные гаметы и мужской фертильности явно недостаточная для целенаправленной селекции [27]. Таким образом, реализация полноценных программ отбора на диплоидном уровне у картофеля, в том числе на завершающем его этапе мейотического удвоения хромосом, невозможна без предварительной селекции, направленной на повышение фертильности исходного диплоидного материала.

мужская фертильность, оцененная по семенной продуктивности, ниже той, что теоретически должна соответствовать жизнеспособности пыльцы исследуемого опылителя [35]. Фертильность, оцененная по результатам гибридизации, получила в литературе название «функциональная мужская фертильность» (ФМФ) [35], или «скрещиваемость» [36]. Очевидно, что ФМФ определяется как абсолютным количеством образующейся пыльцы, так и долей в ней пыльцы, способной доставить мужские гаметы к зародышевому мешку, т.е. пыльцы функционально фертильной. Именно от частоты функционально фертильной пыльцы (ФФП) зависит успех скрещиваний в совместимых комбинациях с участием отобранных нестерильных опылителей. Для косвенной оценки ФФП (до проведения скрещиваний) разработано несколько методов [37]. По опыту лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси, наиболее приемлемым является метод проращивания пыльцы на искусственных питательных средах по Palais et al. [38].

Женская фертильность (способность завязывать ягоды и семена при опылении фертильной пыльцой совместимых опылителей), несмотря на то, что она понижена у дигаплоидов *S. tuberosum* по сравнению с тетраплоидами, все же не является основным лимитирующим фактором в скрещиваниях с участием дигаплоидов. Как было показано в результате многолетнего испытания более двухсот первичных дигаплоидов, большинство из них способно формировать ягоды и семена, хотя высоким уровнем женской фертильности (завязываемость 20 и более семян на ягоду) обладало лишь незначительное число первичных дигаплоидов. Тем не менее, основная их часть могла служить женским компонентом скрещиваний [39].

При гибридизации дигаплоидов картофеля наблюдается сложная картина расщепления по показателям фертильности. Если интенсивность цветения обычно имеет промежуточное значение по сравнению с родителями, то показатели мужской фертильности могут меняться в очень широких пределах. Так, при скрещивании слабо и хорошо пылящих дигаплоидов 226.26 (*S. tuberosum*) и ВД-88-23 (*S. tuberosum* × *S. stenotomum*) вариация признака была от 0 до 2,9 мг/цветок, при средней 0,95 мг/цветок (у родителей соответственно 0,38 и 2,06 мг/цветок). Наследование ФМФ было аналогичным. Средняя величина признака у гибридов имела промежуточное значение, более близкое к лучшему из родителей при скрещивании низкофертильных форм, и близкое к худшему из родителей при скрещивании низко- и высокофертильного образцов [40]. При этом, как и по количеству пыльцы, отмечено выщепление форм, превосходящих лучшего родителя, и форм, уступающих худшему, что говорит об участии рецессивных генов в генетическом контроле этих признаков, а также, вероятно, о взаимодействии генов. Таким образом, даже скрещивание мужски фертильных вторичных дигаплоидов сопровождается выщеплением стерильных форм и генотипов с пониженной мужской фертильностью. С другой стороны, вовлечение в гибридизацию высокофертильных образцов позволяет с большой вероятностью рассчитывать на получение потомства с достаточно высокой фертильностью.

По мнению Carrol и Low, уровень фертильности дигаплоидов *S. tuberosum* определяется соответствующим показателем исходной тетраплоидной формы и эффектом инбридинга [35]. Этой же точки зрения придерживается и ряд других исследователей [26, 41–44]. У тетраплоидных сортов картофеля практически не ведется отбор против неблагоприятных рецессивных аллелей в локусах, контролирующих мейоз и развитие мужского гаметофита, т.к. мужски стерильные формы с высокой комбинационной способностью могут быть использованы в селекционных программах в качестве материнских форм. Вегетативный способ размножения картофеля способствует аккумуляции в сортах таких аллелей. На диплоидном уровне они переходят в гомозиготное состояние, что проявляется в резком снижении фертильности, появлении стерильных форм.

Гипотезу об инбридинге, как основной причине мужской стерильности дигаплоидов картофеля, подтверждают оценки мужской фертильности удвоенных моноплоидов [42, 45, 46]. В частности, у удвоенных моноплоидов *S. phureja* происходило заметное снижение женской фертильности (интенсивности цветения, завязываемости ягод и семян при использовании в качестве материнских форм) по сравнению с исходной гетерозиготной высокофертильной формой и резкое понижение мужской фертильности: из 13 изученных удвоенных моноплоидов менее половины формировали пыльники с небольшим количеством пыльцы, оказавшейся функционально стерильной при тестировании на прорастание *in vitro* [47].

Таким образом, хотя и существует небольшая вероятность появления среди первичных дигаплоидов *S. tuberosum* жизнеспособных мужски фертильных форм, в целом проведение комбинативной селекции на диплоидном уровне с использованием только первичных дигаплоидов сильно затруднено из-за их стерильности и пониженной фертильности.

В связи с этим в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси была предложена программа создания доноров фертильности для гибридизации с первичными дигаплоидами с целью получения мужски фертильного диплоидного исходного материала [24]. Эта программа включала комбинацию метода

инбридинга, имеющего целью выявление и элиминацию аллелей, неблагоприятных для фертильности, и метода гибридизации между высоко фертильными генотипами с целью замещения неблагоприятных аллелей аллелями, которые положительно влияют на процесс развития пыльцы. Осуществление этой программы у диплоидного картофеля затруднено из-за характерной для большинства диплоидных *Solanum* гаметофитной самонесовместимости, связанной с функционированием так называемого S-локуса. Небольшое аллельное разнообразие S-гена может также быть причиной нескрещиваемости между отдельными дигаплоидами картофеля [48].

В результате изучения большой коллекции вторичных дигаплоидов картофеля в нашей лаборатории удалось выделить клон IGC 203/5.7 (на основе вторичного дигаплоида сорта Полесский розовый и межвидового гибрида *S. phureja* × *S. vernei*), обладающий высокой мужской фертильностью и самосовместимостью. Этот клон был включен в гибридизацию с высоко фертильными формами IGC Ju 1.1 и IGC Ju 1.2, выделенными в потомстве от свободного опыления первичных дигаплоидов сорта Юбель (Jubel), которые были использованы в качестве доноров «генов фертильности» (аллелей, оказывающих благоприятное влияние на ФМФ). В качестве донора «генов фертильности» также использовали *S. chacoense*, рекомендованный для этих целей [49]. Среди полученных гибридов отбирали наиболее фертильные формы, которые беккроссировали на Ju 1.2. Беккросс на Ju 1.2. и отбор наиболее фертильных генотипов повторяли и в следующих поколениях (сочетание инбридинга и отбора на фертильность). В результате был получен ряд высоко фертильных вторичных дигаплоидов (на основе преимущественно *S. tuberosum*), предназначенных для повышения мужской фертильности диплоидного исходного материала [24]. Продемонстрировано, что гибридизация мужски стерильных первичных дигаплоидов картофеля с названными высоко фертильными дигаплоидами обеспечивает получение фертильного потомства, которое может быть эффективно использовано в селекции на диплоидном уровне. Так, частота высоко фертильных гибридов в потомстве

мужски стерильного первичного дигаплоида сорта Альпинист IGC 98/100.12 и линии-донора фертильности IGC 01/59.11 составила 100%, а в потомстве дигаплоида сорта Nortena IGC 98/109.13 и линии IGC 01/59.11 – 53% [25, 50].

Восстановлению фертильности дигаплоидов *S. tuberosum* способствует их гибридизация с примитивными культурными и дикими диплоидными видами картофеля [2, 33, 41, 49 и др.]. С одной стороны, диплоидные опылители *Solanum*, выделенные из природных популяций, обычно высокофертильны и выступают в скрещиваниях в качестве источников высокой фертильности. С другой стороны, гибридизация нивелирует эффект инбредной депрессии. Отдельные, немногочисленные экземпляры из числа мужски фертильных межвидовых гибридов, формирующие 2n-гаметы, могут быть непосредственно использованы в скрещиваниях с 4x формами [2]. Однако селекция на диплоидном уровне включает скрещивания между формами, полученными на межвидовой основе, их беккроссирование на обычно низкофертильные дигаплоиды *S. tuberosum*, самоопыление в сочетании с селекцией по определенным признакам [1]. Полигенная природа ФМФ предполагает появление среди потомства от таких скрещиваний форм с разным, в том числе и низким уровнем мужской фертильности. Показано, что при гибридизации вторичных дигаплоидов картофеля, особенно в комбинациях с участием стерильных и низко фертильных форм, преобладают генотипы с пониженной функциональной фертильностью пыльцы [40]. Это существенно затрудняет проведение наиболее важного этапа диплоидной селекции – комбинацию и аккумуляцию желательных и элиминацию нежелательных генов.

Следует также иметь в виду, что во многих случаях при гибридизации дигаплоидов *S. tuberosum* с диплоидными видами картофеля получают мужски стерильное потомство. Причиной этого является цитоплазматическая мужская стерильность, которая обусловлена взаимодействием доминантных ядерных генов, присутствующих у большинства южноамериканских диплоидных видов, и цитоплазматических генов *S. tuberosum* [51].

Получение дигаплоидов картофеля, формирующих фертильную нередуцированную пыльцу

Для того, чтобы можно было в полной мере воспользоваться преимуществами селекции на диплоидном уровне, необходимо, чтобы отобранные по комплексу хозяйственно-ценных признаков генотипы были пригодны к мейотическому удвоению хромосом, то есть обладали способностью образовывать функционально фертильную нередуцированную пыльцу (ФФП и частота $2n$ пыльцы должны быть не менее 10%). Принимая во внимание приведенные выше сведения о генетическом контроле этих признаков, сделать это достаточно сложно.

Для проведения комбинативной селекции на диплоидном уровне признак «формирование $2n$ пыльцы» не является существенным. Более того, высокая частота $2n$ пыльцы нежелательна, так как может затруднять скрещивания между дигаплоидами. Для таких скрещиваний наиболее важным является высокая мужская фертильность селекционного материала, в особенности способность формировать достаточное количество функционально фертильной пыльцы.

Использование созданных в лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси линий-доноров фертильности обеспечивает получение фертильного потомства даже при их гибридизации с мужски стерильными первичными дигаплоидами сортов картофеля, что позволяет вовлечь последние в селекцию на диплоидном уровне. При проведении такой селекции несложно поддерживать приемлемый уровень мужской фертильности, избегая гибридизации с мужски стерильными формами и поддерживая, по возможности, высокий уровень гетерозиготности селекционного материала, не включая в скрещивания близкородственные формы.

Как показывает наш опыт (см. выше), для того, чтобы на завершающем этапе диплоидной

селекции получить генотипы, обладающие, наряду с комплексом хозяйственно-ценных признаков, способностью формировать функционально фертильную нередуцированную пыльцу с достаточной для мейотического удвоения хромосом частотой, необходимо, чтобы оба родителя имели этот признак. Это означает, что гены, ответственные за формирование $2n$ пыльцы, должны быть введены в генетический пул селекционного материала на самых ранних этапах диплоидной селекции: при гибридизации первичных дигаплоидов сортов с линиями-донорами фертильности или при гибридизации дигаплоидов с дикими видами.

Созданные нами линии-доноры фертильности, к сожалению, практически не образуют $2n$ пыльцу. В связи с этим в лаборатории начата программа их совершенствования. Они были вовлечены в гибридизацию с дигаплоидами картофеля разного происхождения, способными образовывать с высокой частотой FDR $2n$ пыльцу. В результате отобран ряд гибридов с высокой ФФП и частотой $2n$ пыльцы 20–40%. Некоторые из них включены в гибридизацию с первичными дигаплоидами с комплексом генов устойчивости к болезням и вредителям. Таким образом, созданный селекционный материал обладает всем необходимым для решения задачи получения на завершающем этапе диплоидной селекции ценных генотипов, пригодных для мейотического удвоения хромосом. Эти гибриды представляют интерес и в качестве родительских форм *S. tuberosum* для получения межвидовых гибридов с целью вовлечения в селекцию ценного генофонда диких видов. Селекционный материал, созданный на основе таких гибридов, также пригоден в перспективе для мейотического удвоения хромосом.

Список используемых источников

1. Chase, S.S. Analytic breeding in *Solanum tuberosum* L. – A scheme utilizing partenotes and other diploid stocks / S.S. Chase // Canadian J. Genet. Cytol. – 1963. – Vol. 5 – P. 359–363.
2. Potato breeding with haploids and $2n$ gametes / S.J. Peloquin [et al.] // Genome. – 1989. – Vol. 31. – P. 1000–1004.
3. Ortiz, R. Potato breeding via ploidy manipulation / R. Ortiz // Plant Breeding Reviews. – Wiley-Interscience, 1998. – Vol. 16. – P. 15–86.
4. Ермишин, А.П. Отбор на диплоидном уровне и манипуляции с пloidностью в селекции картофеля / А.П. Ермишин // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2007. – Т. 5. – С. 21–43.
5. Mendiburu, A.O. Sexual polyploidization and depolyploidization: Some terminology and definitions / A.O. Mendiburu, S.J. Peloquin // The-

or. Appl. Genet. – 1976. – Vol. 48. – P. 137–144.

6. Ramanna, M.S. A re-examination of the mechanisms of 2n-gamete formation in potato and its implications for breeding / M.S. Ramanna // *Euphytica*. – 1979. – Vol. 28. – P. 537–561.

7. Mok, D.W.S. The inheritance of three mechanisms of diploid (2n pollen) formation in diploid potatoes/ D.W.S. Mok, S.J. Peloquin // *Heredity*. – 1975. – Vol. 35 – P. 295–302.

8. Подлиских, В.Е. Изучение цитогенетических механизмов формирования нередуцированной пыльцы у исходного материала для селекции картофеля на диплоидном уровне / В.Е. Подлиских [и др.] // *Цитология и генетика*. – 1996 – Т. 30. – С. 11–16.

9. Podlisskikh, V.E. Formation of metaphase spindle in diploid potato clones with the meiotic abnormality “fused spindles” / V.E. Podlisskikh [et al.] / In: Abstracts of conference papers, posters and demonstrations of 14th Triennial Conference of The European Association for Potato Research. (Sorrento, Italy, May 2–7, 1999). – Sorrento, 1999. – P. 684–685.

10. Подлиских, В.Е. Особенности формирования веретена деления и поведения хромосом в мейозе у образцов диплоидного картофеля с мутацией «слияние веретен» / В.Е. Подлиских, Т.М. Анкудо, Б.Ю. Аношенко // *Цитология*. – 2002. – Т. 44 – С. 996–1003.

11. Mok, D.W.S. Three mechanisms of 2n pollen formation in diploid potatoes / D.W.S. Mok, S.J. Peloquin // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1975. – Vol. 17. – P. 217–225.

12. Werner, J.E. Inheritance and two mechanisms of 2n egg formation in 2x potatoes / J.E. Werner, S.J. Peloquin // *J. Heredity*. – 1990. – Vol. 81. – P. 371–374.

13. Tai, G.C.C. Use of 2n gametes / G.C.C. Tai // *Potato Genetics*; eds. J.E. Bradshaw, G.R. Mackay. – Wallingford (UK): CABI, 1994. – P. 109–132.

14. Hermsen, J.G.Th. Mechanisms and genetic implications of 2n-gamete formation / J.G.Th. Hermsen // *Iowa State J. Res.* – 1984. – Vol. 58 – P. 421–434.

15. Watanabe, K. Genetic significance of mode of polyploidization: somatic doubling or 2n gametes/ K. Watanabe, S.J. Peloquin, M. Endo // *Genome*. – 1991. – Vol. 34. – P. 28–34.

16. Veilleux, R.E. Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding / R.E. Veilleux // *Plant Breeding Review*. – 1985. – Vol. 3. – P. 253–288.

17. Bani-Aameur, F. Frequency of 2n pollen in diploid hybrids between *Solanum phureja* and *Solanum chacoense* / F. Bani-Aameur, F.I. Laurer, R.E. Veilleux // *Potato Res.* – 1992. – Vol. 35. – P. 161–172.

18. Склярова, Н.П. Наследование признака формирования нередуцированной пыльцы у картофеля / Н.П. Склярова, Т.А. Юдина // *Гаметная и зиготная селекция растений*. – Кишинев: Штиинца, 1987. – С. 106–108.

19. Anoshenko, V.Yu. Analysis of variation of microsporogenesis abnormalities leading to FDR 2n pollen formation in diploid potatoes / V.Yu. Anoshenko, V.E. Podlisskikh // 14 Triennial Conference of the European Association for Potato Research (Sorrento, Italy, May 2–7, 1999). – Sorrento, 1999. – P. 688–689.

20. Jacobsen, E. Diploid formation and its importance for the seed set in 4x × 2x crosses in potato / E. Jacobsen // *Z. Pflanzenzuchtg.* – 1980. – Vol. 84. – P. 240–249.

21. Ortiz, R. Recurrent selection for 2n gamete production in 2x potatoes / R. Ortiz, S.J. Peloquin // *J. Genet. Breed.* – 1992. – Vol. 46. – P. 383–390.

22. Mooney, J. Phenotypic recurrent selection for 2n pollen frequency / J. Mooney, S.J. Peloquin // *Amer. Potato J.* – 1992. – Vol. 69. – P. 599.

23. Serquen, F. Recurrent selection for 2n eggs and their use in TPS breeding / F. Serquen, S.J. Peloquin // *Amer. Potato J.* – 1993. – Vol. 70. – P. 839.

24. Yermishin, A.P. The development of initial parental material for breeding disease resistant potatoes at the diploid level / A.P. Yermishin // *Plant Breeding and Seed Science*. – 2000. – Vol. 44. – P. 105–115.

25. Лукша, В.И. Создание диплоидного исходного материала картофеля для маркерсопутствующей селекции на устойчивость к болезням и вредителям: дис. ... канд. биол. наук / В.И. Лукша. – Минск, 2012. – 149 с.

26. Jansky, S.H. Use of potato haploids to put 2x wild species germplasm in usable form / S.H. Jansky, S.J. Peloquin, G.L. Yerk // *Plant Breeding*. – 1990. – Vol. 104. – P. 290–294.

27. Фарміраванне нерэдукаваных гамет у дыгаплоідаў бульбы / В.Я. Падліскіх [і інш.] // *Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук*. – 1995. – № 3. – С. 43–48.

28. Jacobsen, E. Diploid formation and its importance for seed set in 4x × 2x crosses in potato / E. Jacobsen // *Z. Pflanzenzuchtg.* – 1980. – Vol. 82. – P. 240–249.

29. Jacobsen, E. Increase of diplandroid formation and seed set in in $4x \times 2x$ crosses in potatoes by genetical manipulation of dihaploids and some theoretical consequences / E. Jacobsen // *Z. Pflanzenzuchtg.* – 1980. – Vol. 85. – P. 119–121.
30. Ермишин, А.П. Генетические принципы создания и отбора исходного материала в селекции картофеля на гетерозис: дис... д-ра биол. наук / А.П. Ермишин. – Минск, 1998. – 320 с.
31. Вывучэнне фертыльнасці дыгаплоідаў бульбы / В.Я. Падліскіх [і інш.] // *Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 1995. – № 2. – С. 43–49.
32. Hougas, R.W. Haploids of the common potato / R.W. Hougas, S.J. Peloquin, R.W. Ross // *J. Heredity.* – 1958. – Vol. 49. – P. 103–107.
33. Gorea, T. Fertilitat und Kreuzbarkeit der Dihaploiden von *Solanum tuberosum* L. und deren F_1 -Bastarden / T. Gorea // *Z. Pflanzenzuchtg.* – 1970. – Vol. 64. – P. 202–220.
34. Rousselle-Bourgeois, F. Creation et selection de populations diploids de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) / F. Rousselle-Bourgeois, P. Roussele // *Agronomie.* – 1992. – Vol. 12. – P. 59–67.
35. Aspects of male fertility in group Tuberosum dihaploids / C.P. Carroll [et al.] // *Potato Research.* – 1976. – Vol. 19. – P. 109–121.
36. Sosa, R. Use of dihaploids in the breeding of *Solanum tuberosum* L. / R. Sosa, M. Sosa // *Hereditas.* – 1972. – Vol. 70. – P. 135–152.
37. Trognitz, B.R. Comparison of different pollen viability assays to evaluate pollen fertility of potato dihaploids / B.R. Trognitz // *Euphytica.* – 1991. – Vol. 56. – P. 143–148.
38. Pallais, N. Research on the physiology of potato sexual seed production / N. Pallais, N. Fong, D. Berrios // *Innovative methods for propagating potatoes. CIP Rep. 28th Planning Conf.: Proc. int. conf. Lima: CIP, 1984.* – P. 149–168.
39. Trognitz, B.R. Analysis of pollen tube growth *in situ* to investigate self-incompatibility in the wild potato *Solanum commersonii* / B.R. Trognitz // *Euphytica.* – 1995. – Vol. 86. – P. 149–156.
40. Ермишин, А.П. Показатели фертильности гибридного потомства вторичных дигаплоидов картофеля / А.П. Ермишин, Е.В. Воронкова // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 1998. – № 3. – С. 45–52.
41. Male fertility and $2n$ pollen production in haploid-wild species hybrids / S.A. Hermundstad [et al.] // *Amer. Potato J.* – 1985. – V. 62. – P. 479–487.
42. M'Ribu, H.K. Phenotypic variation and correlations between monoploids and doubled monoploids of *Solanum phureja* / H.K. M'Ribu, R.E. Veilleux // *Amer. J. Potato Res.* – Vol. 69, № 7. – P. 447–459.
43. Подлиских, В.Е. Проявление и наследуемость признака «функциональная фертильность пыльцы» у диплоидных форм картофеля межвидового происхождения / В.Е. Подлиских, Е.В. Воронкова, Б.Ю. Аношенко // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 1999. – № 2. – С. 34–38.
44. Anoshenko, B.Yu. Effect of functional female and male fertilities on crossability in diploid potato breeding / B.Yu. Anoshenko, V.E. Podlisskikh // *Potato Research.* – 2000. – Vol. 43. – P. 125–134.
45. Van Breukelen, E.W.M. Parthenogenetic monohaploids ($2n=x=12$) from *Solanum tuberosum* L. and *S. verrucosum* Sehl. and the production of homozygous potato diploids / E.W.M. Van Breukelen, M.S. Ramanna, J.G.Th. Hermsen // *Euphytica.* – 1977. – Vol. 26. – P. 263–272.
46. Uijtewaal, B.A. Morphology and vigour of monohaploid potato clones, their corresponding homozygous diploids and tetraploids and their heterozygous diploid parent / B.A. Uijtewaal, E. Jacobsen, J.G.Th. Hermsen // *Euphytica.* – 1987. – Vol. 36. – P. 745–753.
47. M'Ribu, H.K. Fertility of doubled monoploids of *Solanum phureja* / H.K. M'Ribu, R.E. Veilleux // *Amer. Potato J.* – 1992. – Vol. 69. – P. 447–459.
48. Ермишин, А.П. Генетические основы селекции картофеля на гетерозис / А.П. Ермишин. – Минск: Технология, 1998. – 183 с.
49. Selection for $2n$ gametes and tuberization in *Solanum chacoense* // E.F. Leue [et al.] // *Amer. Potato J.* – 1980. – Vol. 57. – P. 189–195.
50. Лукша, В.И. Вторичные дигаплоиды *Solanum tuberosum* L. как основа для селекции картофеля на диплоидном уровне, направленной на повышение фертильности и устойчивости к патогенам / В.И. Лукша // *Картофелеводство: сб. науч. тр., Минск, 2011.* – Т. 19. – С. 116–127.
51. Grun, P. Evolution of the cultivated potato: a cytoplasmic analysis / P. Grun // *The biology and taxonomy of the Solanaceae. Linnean Soc. Symp. Ser. № 7.* – London: Acad. Press, 1979. – P. 655–665.

Дата поступления статьи 25 июня 2013 г.

АНАЛИЗ СВЯЗИ МЕЖДУ ГЕТЕРОЗИСОМ И ТРАНСГРЕССИВНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТЬЮ ПО ПРИЗНАКАМ ПРОДУКТИВНОСТИ У ГИБРИДОВ ЯРОВОГО ТРИТИКАЛЕ

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

Введение

Метод гибридизации и отбора широко применяется в программах улучшения тритикале для преодоления недостатков данной культуры, а также для получения большего разнообразия исходного материала. При скрещивании различных форм тритикале в F_2 и последующих гибридных поколениях возможно возникновение генотипов, выражение признаков которых выходит за пределы максимального и минимального проявления их у обоих родителей. Случаи проявления таких фенотипов в гибридных поколениях (F_2, \dots, F_n) называют трансгрессивным расщеплением. Трансгрессия может быть положительной, когда значение признака у гибрида выше, и отрицательной, когда оно ниже, чем у родительских форм. Для практической селекции большое значение имеют положительные трансгрессии, которые получены в результате появления лучших рекомбинантов по различным хозяйственным и биологическим признакам. При правильном подборе исходных родительских пар в отдельных комбинациях урожайность гибридов превышает лучший родительский сорт на 25–40%.

В предыдущих исследованиях нами проведен подбор генетически дивергентных роди-

тельских пар тритикале посредством методов молекулярного маркирования и изучено проявление гетерозиса у полученных F_1 -гибридов тритикале [1]. Оценка влияния степени генетической дивергенции родителей на уровень гетерозиса F_1 -гибридов выявила, что вероятность получения гетерозисных гибридов возрастает с увеличением значений генетических дистанций между родительскими компонентами [2].

В настоящее время разрабатываются методы трансгрессивной селекции, однако еще не существует единых объяснений этого генетического явления [3]. Для повышения эффективности селекционного процесса необходим глубокий анализ признаков родительских форм, характера передачи их гибридному потомству, а также характера изменчивости во втором и последующих поколениях. В связи с этим, целью данной работы явилось изучение характера изменчивости количественных признаков у F_2 -гибридов ярового тритикале, а также связи между эффектом гетерозиса по признакам продуктивности в первом поколении и трансгрессивной изменчивостью во втором поколении гибридов.

Материалы и методы

В исследование включены 20 образцов ярового тритикале, в том числе 3 белорусских сорта Узор, Лотос, Ульяна; 3 сорта польской селекции Матейко, Ванад, Дублет; 6 линий из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» и 8 линий с различными системами генов яровизации, отобранных из F_8 , ранее синтезированных нами первичных тритикале [4]. Выделенные на основе молекулярного анализа 9 генетически различающихся генотипов были скрещены по диаллельной схеме 9×9 [2].

В 2012 году проведено испытание F_1 и F_2 полученных 36 гибридов на Биологической опытной станции в двух рендомизированных по-

вторностях на однорядковых делянках длиной 100 см по 20 растений в рядке. Анализировали следующие признаки: продуктивную кустистость, длину главного колоса, число колосков и зерен главного колоса, массу зерна с главного колоса и растения, массу 1000 зерен.

Для количественной оценки гетерозиса у F_1 -гибридов использовали 2 метода: по отношению к среднему выражению признака у родителей (G_{cp}) и к лучшему родителю (G_n) [5]. Показатели трансгрессивной изменчивости в F_2 (T_c - степень трансгрессии, % и T_n - частота трансгрессии, %) определяли по формулам Г.С. Воскресенской и В.И. Шпота [6].

Результаты и обсуждение

Анализ продуктивности растений F_1 -гибридов ярового тритикале выявил гетерозисный эффект по всем изученным признакам у 18 комбинаций из 36. Лучшими компонентами скрещивания в плане получения гетерозисных гибридов оказались линии 11, 39(6) и 3(9). С участием данных линий Γ_{cp} по основным элементам продуктивности наблюдался в 5 комбинациях из 8.

Чаще всего истинный гетерозис проявлялся по признаку «продуктивная кустистость» – в 28 комбинациях из 36 изученных. По массе зерна с растения – основному признаку, определяющему урожайность злаков, – Гл выявлен в 25 гибридных комбинациях из 36 (рис. 1). Уровень гетерозиса также был высоким и варьировал от 8,73% (Матейко \times 49(10)) до 89,79% (Дублет \times 9(9)).

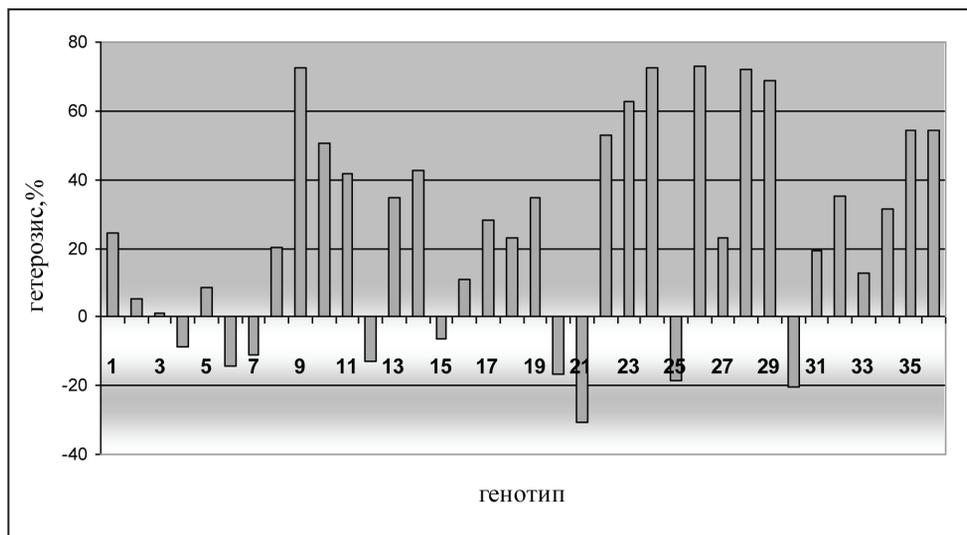


Рис. 1. Истинный гетерозис (%) у F_1 -гибридов ярового тритикале по массе зерна с растения: 1 – Матейко \times 39(6); 2 – Матейко \times 11; 3 – Матейко \times 3(9); 4 – Матейко \times 9(9); 5 – Матейко \times 49(10); 6 – Матейко \times Дублет; 7 – Матейко \times Узор; 8 – Матейко \times Ванад; 9 – Ванад \times 39(6); 10 – Ванад \times 11; 11 – Ванад \times 3(9); 12 – Ванад \times 9(9); 13 – Ванад \times 49(10); 14 – Ванад \times Дублет; 15 – Ванад \times Узор; 16 – Узор \times 39(6); 17 – Узор \times 11; 18 – Узор \times 3(9); 19 – Узор \times 9(9); 20 – Узор \times 49(10); 21 – Узор \times Дублет; 22 – Дублет \times 39(6); 23 – Дублет \times 11; 24 – Дублет \times 3(9); 25 – Дублет \times 9(9); 26 – Дублет \times 49(10); 27 – 49(10) \times 39(6); 28 – 49(10) \times 11; 29 – 49(10) \times 3(9); 30 – 49(10) \times 9(9); 31 – 9(9) \times 39(6); 32 – 9(9) \times 11; 33 – 9(9) \times 3(9); 34 – 3(9) \times 39(6); 35 – 3(9) \times 11; 36 – 11 \times 39(6).

Гетерозис по массе и числу зерен главного колоса наблюдался в пределах 6,15–64,53% и 5,50–28,39% соответственно, по массе 1000 зерен – 5,81–29,81%. По признакам «длина главного колоса» и «число колосков в главном колосе» гетерозисный эффект был ниже по сравнению с другими признаками и составил 7,85–14,49% и 10,64–11,97% соответственно. Кроме того, по числу колосков в главном колосе выявлено меньше всего гетерозисных комбинаций – 3 из 36 (рис. 2).

В F_2 изучали явление трансгрессии у ярового тритикале. У большинства изученных гибридов обнаружено положительное трансгрессивное расщепление в F_2 по продуктивной кустистости, числу и массе зерен главного

колоса, массе зерен с растения. Наибольшее число комбинаций с положительными трансгрессиями выявлено по массе зерна с растения: 34 из 36. По данному признаку отмечен и самый высокий уровень трансгрессивного расщепления: степень трансгрессии колебалась в пределах от 2,4% до 164,5%, а частота составила 3,3–60,7% (табл. 1). Высокими показателями трансгрессии по массе зерна с растения характеризовались гибриды Матейко \times Ванад, Дублет \times 9(9), 49(10) \times 11, Матейко \times 9(9), 49(10) \times 3(9).

По продуктивной кустистости и массе зерна главного колоса положительные трансгрессии проявили по 32 гибридные комбинации из 36. Степень трансгрессии по данным признакам

также была высока и находилась в пределах 10–80,7% и 6,1–70,8% соответственно. Частота выщепления трансгрессивных форм составила 3,7 – 54,5% по продуктивной кустистости, 3,3–66,7% – по массе зерна главного колоса. Необходимо отметить, что большая частота трансгрессии отмечена у гибридов с лучшими максимальными значениями продуктивной ку-

стистости в F_2 . Высокая степень трансгрессии по сравнению с другими комбинациями по этому признаку наблюдалась у гибридов Ванад \times 49(10), Матейко \times Ванад, Ванад \times 39(6), 49(10) \times 3(9), Матейко \times Дублет (табл. 1). По массе зерна главного колоса можно выделить комбинации Дублет \times 39(6), 3(9) \times 11, Узор \times 3(9), 49(10) \times 11, Матейко \times Ванад.

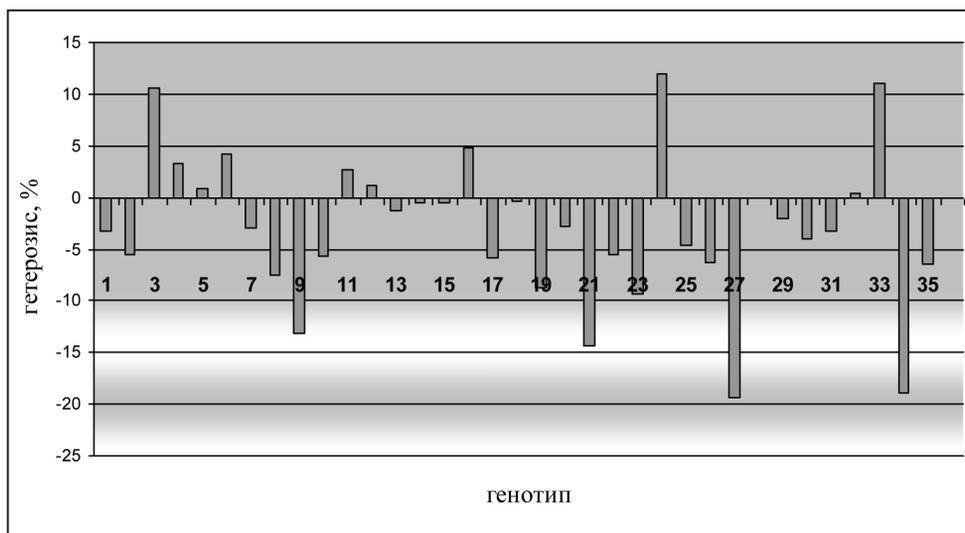


Рис. 2. Истинный гетерозис (%) у F_1 -гибридов ярового тритикале по числу колосков главного колоса: 1 – Матейко \times 39(6); 2 – Матейко \times 11; 3 – Матейко \times 3(9); 4 – Матейко \times 9(9); 5 – Матейко \times 49(10); 6 – Матейко \times Дублет; 7 – Матейко \times Узор; 8 – Матейко \times Ванад; 9 – Ванад \times 39(6); 10 – Ванад \times 11; 11 – Ванад \times 3(9); 12 – Ванад \times 9(9); 13 – Ванад \times 49(10); 14 – Ванад \times Дублет; 15 – Ванад \times Узор; 16 – Узор \times 39(6); 17 – Узор \times 11; 18 – Узор \times 3(9); 19 – Узор \times 9(9); 20 – Узор \times 49(10); 21 – Узор \times Дублет; 22 – Дублет \times 39(6); 23 – Дублет \times 11; 24 – Дублет \times 3(9); 25 – Дублет \times 9(9); 26 – Дублет \times 49(10); 27 – 49(10) \times 39(6); 28 – 49(10) \times 11; 29 – 49(10) \times 3(9); 30 – 49(10) \times 9(9); 31 – 9(9) \times 39(6); 32 – 9(9) \times 11; 33 – 9(9) \times 3(9); 34 – 3(9) \times 39(6); 35 – 3(9) \times 11; 36 – 11 \times 39(6).

Таблица 1

Трансгрессия основных компонентов продуктивности у F_2 -гибридов яровых тритикале, %

Гибридные комбинации	Продуктивная кустистость		Главный колос				Масса зерна 1 растения	
			Масса зерен		Масса 1000 зерен			
	Тс	Тч	Тс	Тч	Тс	Тч	Тс	Тч
Матейко \times 39(6)	50,0	26,7	8,3	13,3	78,5	43,3	-5,1	0
Матейко \times 11	-5,9	6,7	43,3	40,0	63,6	36,7	9,4	30,0
Матейко \times 3(9)	28,3	13,3	30,0	40,0	39,3	50,0	14,3	50,0
Матейко \times 9(9)	42,9	20,0	16,7	26,7	111,9	50,0	2,6	16,7
Матейко \times 49(10)	40,4	20,0	33,3	23,3	98,1	40,0	12,6	23,3
Матейко \times Дублет	55,0	26,7	6,1	13,3	66,4	26,7	-3,6	0
Матейко \times Узор	57,1	20,0	20,0	33,3	41,6	20,0	2,5	13,3
Матейко \times Ванад	71,7	40,0	43,3	13,3	164,5	46,7	18,0	46,7
Ванад \times 39(6)	63,2	36,7	16,7	16,7	10,3	46,7	1,5	3,3
Ванад \times 11	34,3	20,0	10,0	23,3	78,2	30,0	-7,4	30,0
Ванад \times 3(9)	35,1	43,3	36,7	36,7	46,5	33,3	20,5	20,0

Продолжение табл. 1

Гибридные комбинации	Продуктивная кустистость		Главный колос				Масса зерна 1 растения	
			Масса зерен		Масса 1000 зерен			
	Тс	Тч	Тс	Тч	Тс	Тч	Тс	Тч
Ванад × 9(9)	18,6	6,7	5,6	13,3	33,3	13,3	-1,4	3,3
Ванад × 49(10)	80,7	36,7	20,0	33,3	34,7	33,3	28,9	50,0
Ванад × Дублет	52,6	50,0	6,1	10,0	17,8	30,0	5,5	6,7
Ванад × Узор	10,0	5,0	6,7	25,0	13,6	10,0	-4,3	0
Узор × 39(6)	28,6	23,3	-13,9	0	24,8	20,0	-24,1	0
Узор × 11	24,3	20,0	18,5	20,0	25,6	16,7	-18,6	0
Узор × 3(9)	28,6	16,7	59,3	50,0	52,8	36,7	6,3	10,0
Узор × 9(9)	32,9	30,0	13,9	16,7	31,8	33,3	10,9	13,3
Узор × 49(10)	0	0	40,7	66,7	-6,4	10,0	6,9	23,3
Узор × Дублет	0	6,7	15,2	10,0	3,2	6,7	13,1	10,0
Дублет × 39(6)	28,1	37,9	97,2	3,4	43,9	3,4	-8,8	0
Дублет × 11	14,9	17,9	6,1	10,7	79,1	60,7	-2,8	0
Дублет × 3(9)	28,7	26,7	9,1	13,3	83,6	56,7	6,5	6,7
Дублет × 9(9)	14,9	6,9	21,2	13,8	146,3	37,9	3,4	3,4
Дублет × 49(10)	35,1	16,7	18,2	10,0	131,3	30,0	7,6	10,0
49(10) × 39(6)	45,6	35,0	-2,8	10,0	-6,9	10,0	-9,3	0
49(10) × 11	23,9	16,7	54,2	33,3	139,1	56,7	5,9	10,0
49(10) × 3(9)	57,9	54,5	36,4	36,4	105,1	59,1	11,3	22,7
49(10) × 9(9)	28,6	16,7	13,9	0	21,4	3,3	-10,1	0
9(9) × 39(6)	18,6	13,3	33,3	23,3	52,4	23,3	6,2	16,7
9(9) × 11	10,0	3,7	5,6	14,8	2,4	7,4	8,6	11,1
9(9) × 3(9)	0	5,0	5,6	10,0	11,1	20,0	-4,6	5,0
3(9) × 39(6)	37,7	20,0	0	3,3	19,8	10,0	-5,9	0
3(9) × 11	19,4	20,0	70,8	36,7	95,3	50,0	2,8	10,0
11 × 39(6)	14,9	16,7	8,3	6,7	45,7	23,3	0,7	3,3

Значительно реже встречались трансгрессивные формы в F_2 по длине и числу колосков главного колоса, массе 1000 зерен. По признаку «число колосков главного колоса» из 36 гибридных комбинаций только у 12 выявлена положительная степень трансгрессии. Значения по данному показателю были также не высоки – от 0,74% до 29,6%. Самый низкий уровень трансгрессивного расщепления по сравнению с остальными признаками отмечен по длине главного колоса. Степень трансгрессии по этому признаку не превышала 27,3%.

Среди гибридов F_2 выявлены 5 комбинаций, которые проявили положительное трансгрессивное расщепление по всем изученным признакам: 9(9) × 39(6), 49(10) × 3(9), Ванад × 3(9), Матейко × 3(9), Матейко × 9(9), Матейко ×

49(10). Можно отметить, что большинство из данных комбинаций созданы с участием сорта Матейко и линий 3(9), 49(10). Кроме того, гибриды на основе этих генотипов, как правило, характеризовались высокими показателями трансгрессии по таким важным признакам урожайности как масса зерна растения и главного колоса, масса 1000 зерен (табл. 1).

Значительная часть гибридного материала (15 комбинаций из 36) имела отрицательную степень трансгрессии только по одному из изученных признаков. Как правило, для данных генотипов отрицательные трансгрессии отмечены по числу колосков главного колоса.

Наименьшая трансгрессивная изменчивость установлена для комбинаций 49(10) × 39(6) и Узор × 39(6), для которых положительные

трансгрессии выявлены только по 2 и 3 признакам соответственно. Следует отметить, что комбинации, созданные при участии 39(6), часто демонстрировали самый низкий уровень трансгрессивного расщепления.

Для повышения эффективности селекционного процесса немаловажное значение имеет знание корреляционных отношений между эффектом гетерозиса по признакам продуктивности в первом поколении и трансгрессивной изменчивостью во втором поколении гибридов. Выявление таких корреляционных связей позволяет определить критерии отбора высокопродуктивных форм в последующих гибридных

поколениях. Анализ проявления гетерозиса в F_1 и трансгрессивной изменчивости в F_2 показал, что по признакам, для которых отмечен высокий эффект гетерозиса у гибридов F_1 (масса зерна растения и главного колоса, продуктивная кустистость) обнаружен и наиболее высокий уровень трансгрессивного расщепления в F_2 . В то время, как по признакам длина и число колосков главного колоса, где эффект гетерозиса оказался ниже, трансгрессивные формы в F_2 встречались значительно реже. Однако тесной связи между эффектом гетерозиса в F_1 и показателями трансгрессивной изменчивости в F_2 обнаружено не было (табл. 2).

Таблица 2

Корреляционные связи между эффектом гетерозиса (Нл, %) у F_1 -гибридов и показателями трансгрессивной изменчивости (Тс и Тч, %) у F_2 -гибридов ярового тритикале по признакам продуктивности

Признаки	Нл-Тс	Нл-Тч	Тс-Тч
Продуктивная кустистость растения	0,18	0,27	0,78**
Длина главного колоса	0,58**	0,63**	0,80**
Число колосков главного колоса	0,17	0,34*	0,40*
Число зерен главного колоса	0,17	0,32	0,61**
Масса зерна главного колоса	0,24	0,05	0,48**
Масса 1000 зерен	0,24	0,03	0,72**
Масса зерна 1 растения	0,27	0,42**	0,68**
$P_{0,05}$	0,33	0,33	0,33
$P_{0,01}$	0,42	0,42	0,42

* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$.

Достоверно положительные корреляционные связи между гетерозисом и степенью трансгрессии установлены только по признаку «длина

главного колоса», а между гетерозисом и частотой трансгрессии – по длине и числу колосков главного колоса, массе зерен растения (табл. 2).

Заключение

У большинства гибридов ярового тритикале, полученных на основе 9 генотипов, различающихся по уровню генетических дистанций, обнаружен гетерозисный эффект в F_1 и положительное трансгрессивное расщепление в F_2 по продуктивной кустистости, числу и массе зерен главного колоса, массе зерен с растения. Невысокий уровень гетерозиса и трансгрессивной изменчивости выявлен по длине и числу колосков главного колоса, что указывает на малую возможность улучшения

данных признаков отбором. Однако тесной связи между эффектом гетерозиса в F_1 и показателями трансгрессивной изменчивости в F_2 обнаружено не было.

Выделены гибриды с высокой степенью трансгрессии и с большой частотой выщепления высокопродуктивных растений по основным признакам продуктивности. Установлено, что большинство данных генотипов создано на основе сорта тритикале Матейко и линий 3(9), 49(10).

Список используемых источников

1. Orlovskaya, O.A. Genetic Polymorphism Evaluation of Spring Triticale (*×Triticosecale* Wittmack) Samples with Use of RAPD and ISSR Markers / O.A. Orlovskaya, L.V. Koren, L.V. Khotyleva // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2012. – Vol. 2, No. 6. – P. 508–512.
2. Орловская, О.А. Влияние степени генетической дивергенции родителей на уровень гетерозиса F₁-гибридов яровой тритикале / О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева // Экологическая генетика. – 2012 – Т. X, № 3. – С. 3–9.
3. Орлюк, А.П. Принципы трансгрессивной селекции пшеницы: монография / А.П. Орлюк, В.В. Базалий. – Херсон, 1998. – 271 с.
4. Khotyljova, L.V. Development and study of spring triticale lines with *Vrn* genes / L.V. Khotyljova, L.V. Koren, L.N. Kaminskaya // Proc. 4th International Triticale Symposium, Alberta, Canada. – 1998. – P. 21–23.
5. Турбин, Н.В. Диаллельный анализ в селекции растений / Н.В. Турбин, Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина. – Минск: Наука и техника, 1974. – 182 с.
6. Воскресенская, Г.С. Трансгрессия признаков у гибридов BRASSICA и методика количественного учета этого явления / Г.С. Воскресенская, В.И. Шпота // Селекция и семеноводство. – 1967. – № 6. – С. 18–20.

Дата поступления статьи 5 июля 2013 г.

Е.В. Антоненко, В.А. Лемеш, Е.М. Кременевская, Н.М. Ермишина, О.И. Зайцева

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ЛОКУСОВ ХРОМОСОМЫ 5А У ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ

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

Введение

Использование клеточных технологий, основанных на культивировании *in vitro* органов и тканей высших растений, позволяет значительно облегчить и ускорить традиционный селекционный процесс. Метод культуры пыльников, достаточно широко используемый в настоящее время, имеет значительные перспективы, поскольку может быть направлен не только на создание линий удвоенных гаплоидов, но и на предотвращение элиминации рекомбинантных гамет под давлением естественного стабилизирующего отбора [1, 2]. Именно на стадии гаметогенеза действие естественного отбора приводит к значительному сужению спектра доступной селекционеру генотипической изменчивости, а также обуславливает формирование средних по адаптивности форм. В условиях культуры *in vitro* возможно не только вовлечение в искусственный отбор огромного числа генотипов, но и создание высокой жесткости отбора в строго контролируемых условиях [3, 4].

Использование биотехнологических подходов представляется весьма перспективным для ускоренного создания новых сортов важнейших сельскохозяйственных культур – пшеницы и тритикале. Пшеница (род *Triticum*) является одной из наиболее широко выращиваемых продовольственных культур, занимая третье место после кукурузы и риса, и основной зерновой культурой многих стран мира. Из общего мирового производства зерна на долю пшеничного приходится около 27%. Особое положение пшеницы среди злаков как генетического объекта обусловлено различным уровнем пloidности генотипа и их широкой адаптацией в различных экологических условиях. Тритикале (*× Triticosecale* Wittm.) – еще одна ценная злаковая культура, полученная в результате объединения геномов пшеницы и ржи, с уникальным сочетанием целого ряда хозяйственно-биологических особенностей,

присущих исходным видам. К их числу относятся высокий потенциал урожайности зерна и зеленой массы, повышенные адаптивные свойства (высокая зимостойкость, засухоустойчивость, нетребовательность к почвам), комплексный иммунитет к грибным заболеваниям, высокое содержание лизина и крахмала в зерне, а также основных питательных веществ в зеленой массе, отсутствие мякинной оболочки и т.д. [5].

Однако, несмотря на достигнутые успехи, обе культуры нуждаются в серьезной селекционной доработке. В частности, недостаточно пластичные сорта тритикале иногда снижают продуктивность даже при небольших погодных отклонениях [1], а низкая пластичность сортов связана, прежде всего, с ограниченным генетическим разнообразием исходного материала.

Для улучшения сортов и селекционных форм необходимо обогащать генофонд этих культур и повышать эффективность их селекции различными, в том числе и биотехнологическими, методами. Сложность заключается в том, что злаки, по сравнению с другими сельскохозяйственными растениями, характеризуются особенно низкой способностью к пролиферации в условиях *in vitro* [6, 7]. Хотя у некоторых из них, в частности рода *Hordeum*, выход гаплоидных растений-регенерантов достаточно высок [8, 9], для большинства видов получение гаплоидов представляет собой весьма трудоемкий процесс. Масштабы использования биотехнологических подходов при создании линий удвоенных гаплоидов остаются ограниченными, в том числе и из-за того, что до настоящего времени не идентифицированы гены, контролирующие признаки, характеризующие способность растений к перестройке морфогенетических процессов в культуре гаметофитных тканей и последующей регенерации растений.

Анализ литературы свидетельствует о том, что имеются лишь отрывочные данные о генетическом контроле отзывчивости растений к культивированию тканей, в частности, о генах, контролирующих пыльцевой эмбриогенез. Tuveesson et al., определяя частоту регенерации зеленых растений в культуре пыльников, донором которых были родительские формы пшеницы и гибриды, полученные путем реципрокных скрещиваний, установили, что генотип определяет 85% изменчивости по данному признаку [10].

Исследование процессов пыльцевого эмбриогенеза *in vitro* у гибридов первого поколения, реципрокных гибридов и аллоплазматических линий позволило установить, что у пшеницы, ячменя, риса, тритикале основные признаки андрогенеза (частота возникновения эмбриогенных структур, каллусов, регенерация альбиносных и зеленых растений и их соотношение) наследуются независимо друг от друга. Для культуры пыльников пшеницы и ячменя был отмечен, в основном, аддитивный тип взаимодействия генов, контролирующих признак «выход эмбрионидов» и, как правило, эпистатический контроль регенерационной способности. Анализ результатов диаллельных скрещиваний дал возможность предположить участие двух генов в индукции эмбрионидов и 1–2 генов – в контроле регенерационной способности растений [11]. Tuveesson et al. показали, что на частоту возникновения потенциальных зеленых структур в культуре пыльников пшеницы влияют два или более генов [10].

В настоящее время для определения локализации генов используется ряд различных молекулярно-генетических маркеров. Наиболее широко в исследованиях генетического полиморфизма применяются микросателлиты, широко распространенные в эукариотических геномах и представляющие собой универсальную систему генетических маркеров для анализа наследуемых изменений на уровне ядерной ДНК.

Среди злаков микросателлиты достаточно хорошо изучены и широко используются в качестве молекулярных маркеров у представителей родов, имеющих важное сельскохозяйственное значение, таких, как пшеница (*Triticum* L.), рожь (*Secale* L.), ячмень (*Hordeum* L.). У злаков на повторяющиеся последовательности приходится от 15% до 80% генома,

в частности, молекулярно-генетическая карта *T. aestivum* содержит более 1500 SSR-маркеров [12, 13]. Они могут образовывать тандемные кластеры либо иметь дисперсную локализацию в геноме.

Согласно общепринятой точке зрения, полиморфизм микросателлитов обусловлен ошибками (эффект «проскальзывания») в процессе репликации или репарации ДНК [14]. Средний темп мутирования динуклеотидных повторов оценивают примерно в $6,9 \times 10^{-4}$ [15], хотя эти оценки могут существенно различаться [16]. Аллельные варианты микросателлитного локуса оцениваются как продукты амплификации разной длины (разное количество повторов) при использовании пары праймеров к его флангам. Для таких локусов типичен высокий уровень полиморфизма (мутируют в 1000 раз чаще, чем структурные гены) и наличие специфических механизмов возникновения аллельных вариантов (ошибки репликации, ошибки кроссинговера). По микросателлитным локусам обнаруживается высокий уровень гетерозиготности [17].

Таким образом, несмотря на то, что индукция пыльцевого эмбриогенеза у растений лежит в основе многих современных биотехнологий, эффективность применения этого метода существенно снижена. Одной из причин является тот факт, что хотя в последнее время появляется все больше научных работ, посвященных поиску генетических маркеров, связанных с индукцией морфогенеза в культуре *in vitro*, информация о возможной локализации генов, отвечающих за процесс реализации программы пыльцевого эмбриогенеза *in vitro* достаточно противоречива. Не созданы и информативные молекулярно-генетические маркеры, необходимые для их картирования. Дополнение метода пыльцевого андрогенеза эффективными приемами обнаружения, сохранения и оценки ценных генотипов позволит расширить его применение в селекции растений.

В связи с этим, целью данного научного исследования является поиск молекулярных маркеров генов пшеницы, связанных с процессом морфогенеза в культуре *in vitro*, для последующего определения их хромосомной локализации и изучение возможности использования маркеров, разработанных для пшеницы для аналогичного исследования генома тритикале.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись 2 сорта мягкой яровой пшеницы белорусской селекции (Ростань, Рассвет), обладающие низкой андрогенетической способностью в культуре пыльников, и 2 линии удвоенных гаплоидов мягкой яровой пшеницы (Dh 52-02-06, Dh 48-02-06), полученные методом культуры пыльников в лаборатории генетики и клеточной инженерии растений ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» и показавшие высокий андрогенетический потенциал в культуре *in vitro*, а также 65 растений отдаленных гибридов F_4 и F_5 гексаплоидного тритикале и мягкой пшеницы и их родительские формы: тритикале (сорта: Лана, Лотас, сортообразец КСИ 18/05) и пшеница (сорт Рассвет, сортообразцы: Р-2, Р-19). Гибриды были представлены в следующих комбинациях:

- 1) Лотас × Р-2 (F_4) – 3 растения;
- 2) КСИ 18/05 × Ростань (F_4) – 10 растений;
- 3) КСИ 18/05 × Ростань (F_5) – 36 растений;
- 4) Лана × Р19 (F_5) – 6 растений;
- 5) Лотас × Рассвет (F_4) – 10 растений.

Растения выращивали на экспериментальном поле Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Образцы высевались вручную. Посев осуществлялся в трех повторностях. Площадь учетной делянки – 1 м². Высевали 5 рядов по 20 зерен на ряд для пшеницы и 15 зерен для тритикале, ширина междурядий – 20 см.

Молекулярно-генетическая оценка аллельного состава генов. Выделение ДНК. Выделение ДНК проводили из листьев растений пшеницы по методике Дорохова и Клоке [18] с модификациями в 5 повторностях. Около 100 мг навески свежих листьев тщательно растирали до гомогенного состояния непосредственно в микропробирке объемом 2 мл с добавлением 400 мкл экстракционного буфера и инкубировали 15 минут при 65 °С и 5 минут на ледяной бане. Супернатант отделяли путем центрифугирования в течение 10 мин при 12000g. ДНК очищали в 400 мкл смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт, затем – в 400 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт. Для осаждения ДНК в пробирки с супернатантом добавляли двойной объем 96% этилового спирта, охлажденного при -20 °С и оставляли пробирки при +4 °С на 20 ч. Осадок промывали сначала 70%-ым, затем 96%-ым этиловым спиртом, охлажденными до -20°С и подсушивали. Осадок ДНК растворяли в 100 мкл стерильного ТЕ-буфера. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Ultrospec 3300pro.

Для анализа полиморфизма использовали праймеры к микросателлитным локусам, расположенным на 5 хромосоме А генома мягкой яровой пшеницы, указанные в табл. 1. Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР подобраны с использованием базы данных GrainBase 2.0 [19].

Таблица 1

Последовательности праймеров к микросателлитным локусам, расположенным на хромосоме 5А мягкой пшеницы

Локус	Последовательность праймеров
<i>Xgwm304</i>	5' AGGAAACAGAAATATCGCGG 3' 5' AGGACTGTGGGGAATGAATG 3'
<i>Xgwm415</i>	5' GATCTCCCATGTCCGCC 3' 5' CGACAGTCGTCACCTGCCTA 3'
<i>Xgwm154</i>	5' TCACAGAGAGAGAGGGAGGG 3' 5' ATGTGTACATGTTGCCTGCA 3'
<i>Xgwm293</i>	5' TACTGGTTCACATTGGTGCG 3' 5' TCGCCATCACTCGTTCAAG 3'
<i>Xgwm205</i>	5' CGACCCGGTTCACCTCAG 3' 5' AGTCGCCGTTGTATAGTGCC 3'

Продолжение табл. 1

Локус	Последовательность праймеров
<i>Xgwm156</i>	5' CCAACCGTGCTATTAGTCATTC 3' 5' CAATGCAGGCCCTCCTAAC 3'
<i>Xgwm595</i>	5' GCATAGCATCGCATATGCAT 3' 5' GCCACGCTTGGACAAGATAT 3'
<i>Xgwm186</i>	5' GCAGAGCCTGGTTCAAAAAG 3' 5' CGCCTCTAGCGAGAGCTATG 3'
<i>Xgwm126</i>	5' CACACGCTCCACCATGAC 3' 5' GTTGAGTTGATGCGGGAGG 3'
<i>Xgwm291</i>	5' CATCCCTACGCCACTCTGC 3' 5' AATGGTATCTATTCCGACCCG 3'

Программа для проведения ПЦР:

Для праймеров к локусам *Xgwm304*, *Xgwm415*, *Xgwm154*, *Xgwm293*:

3 минуты при 94 °С; 1 минута при 94 °С, 1 минута при 55 °С, 2 минуты при 72 °С (45 циклов); 10 минут 72 °С [19].

Для праймеров к локусам *Xgwm205*, *Xgwm156*, *Xgwm595*, *Xgwm186*, *Xgwm126*, *Xgwm291*:

3 минуты при 94 °С; 1 минута при 94 °С, 1 минута при 60 °С, 2 минуты при 72 °С (45 циклов); 10 минут 72 °С [19].

Электрофорез полученных продуктов амплификации проводили в 6% полиакриламидном геле при напряжении 40–100 В. Окраска геля проводилась в растворе бромистого этидиума. Размер полученных фрагментов рассчитывался с использованием программы Quantum-Capt.

Результаты и обсуждение

Чтобы полностью понять механизмы индуцированного андрогенеза, необходимо идентифицировать гены, участвующие в перестройке программы развития со спорофитного на гаметофитный путь развития. В настоящее время информация по этому вопросу крайне ограничена. Решить эту проблему могут современные методы картирования геномов. Одним из них является метод определения сцепления микросателлитных маркеров и исследуемых признаков в популяциях родителей и гибридов второго поколения, позволяющий определить хромосомную локализацию целевого гена с точностью до нескольких сМ [20].

Выявлено, что на эффективность индукции каллуса в культуре пыльников пшеницы оказывают влияние хромосомы 2А, 2В, 4В, 6D [21, 22, 23]. Анеуплоидный анализ обнаружил влияние отдельных плеч (L – long, S – short) хромосом 1BS, 1BL, 3AS, 3AL, 5AS, 5AL, 5BS, 5BL, 7DS, 7DL на частоту эмбриогенеза в культуре пыльников мягкой пшеницы. При этом было показано, что наличие практически всех

перечисленных хромосомных плеч стимулирует выход эмбриоидов, и только 1BS и 1BL – снижают [21]. В работе Agache et al. с использованием моносомиков сорта Chinese Spring по хромосоме 1D и линий, полученных при замещении хромосомы 5В или плеча 5BL сорта Chinese Spring в шесть других сортов, показано, что гены, расположенные на 1D хромосоме и 5BL хромосомном плече Chinese Spring, увеличивают частоту индукции эмбриогенеза [11].

В культуре пыльников мягкой пшеницы сорта Chinese Spring геном А достоверно влияет на регенерацию зеленых растений, геном В – на общую регенерацию и формирование альбиносных растений-регенерантов, геном D – на все перечисленные показатели [22]. Использование гибридов F₁, гетерозиготных по 1В хромосоме, позволило выявить, что увеличение общей регенерационной способности происходит в присутствии 1В/1R замещений в хромосомном наборе мягкой пшеницы. При этом отсутствие плеч 1BL и 1BS не изменяет общую регенерационную способность рас-

тений, в то время как присутствие 1RS плеча стимулирует увеличение частоты образования растений-регенерантов [11]. В культуре пыльников мягкой пшеницы показано, что гены хромосомы 2D способствуют увеличению выхода зеленых растений-регенерантов, а гены хромосомы 1BL – альбиносных [23].

В последнее время появляется все больше работ, посвященных поиску генетических маркеров, связанных с процессами регенерации растений в культуре *in vitro* [14, 15]. В работах Mano et al. и Bregitzer et al. с использованием линий удвоенных гаплоидов от скрещивания сортов ячменя Steptoe и Morex были найдены пять локусов QTL, влияющих на число зеленых растений-регенерантов в культуре пыльников, а также два QTL, связанные с регенерацией альбиносных растений [24, 25]. В исследованиях Topr et al. с использованием пятидесяти линий удвоенных гаплоидов от скрещивания двух сортов пшеницы Ciano и Walter, на хромосомах 2AL, 2BL и 5BL было найдено четыре QTL, влияющих на частоту формирования зеленых растений-регенерантов [26]. Три аллеля, выявленные на хромосомах 2AL и 2BL, были получены от отзывчивого сорта Ciano. Благоприятствующий формированию зеленых растений локус количественных признаков, расположенный на хромосоме 5BL, был передан от низко отзывчивого родителя Walter. Вместе с тем не было

показано достоверного влияния исследованных локусов на формирование эмбриоидов, что еще раз подтверждает независимый контроль отдельных параметров пыльцевого эмбриогенеза.

Для идентификации генов, определяющих способность растений к индукции пыльцевого эмбриогенеза, и их картирования с помощью микросателлитных маркеров необходимо осуществить корректный подбор соответствующих праймеров. Мягкая пшеница (*T. aestivum* L.) является достаточно трудным объектом для генетических исследований, в силу сложности строения генома. Данный вид имеет аллогексаплоидный геном естественного происхождения ($2n=6x=42$, AABBDD), в образовании которого участвовали диплоидные виды *T. urartu* (геном А), *Aegilops speltoides* (геном В) и *Ae. tauschii* (геном D) [27]. Из-за большого числа хромосом не представляется возможным вести поиск соответствующих маркеров по всему геному. Поскольку к настоящему времени несколькими группами исследователей получены данные о том, что на эффективность индукции пыльцевого эмбриогенеза и регенерации растений пшеницы оказывают заметное влияние хромосомы 5 гомеологической группы [10, 11, 12], основное внимание в данном исследовании было сосредоточено на изучении генов, локализованных на хромосоме 5А. Хромосома с картированными микросателлитными последовательностями представлена на рис. 1.

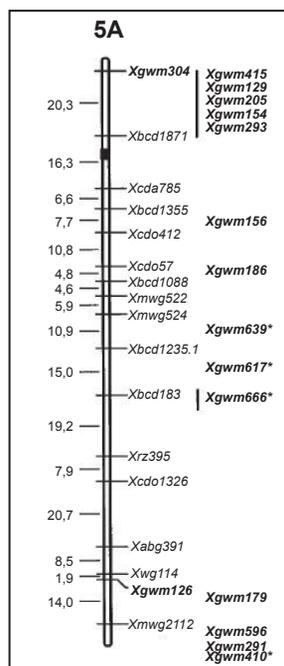


Рис. 1. Генетическая карта хромосомы 5А мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) [13]

Отобранные нами для использования в дальнейшем исследовании маркеры микросателлитных локусов представлены в табл. 2. Детальный анализ имеющейся в литературе информации показал, что основное число

микросателлитов имеет сходные локусы в нескольких хромосомах генома. Чтобы повысить точность исследований, нами были подобраны 10 маркеров, локализованных исключительно на хромосоме 5А.

Таблица 2

Микросателлитные локусы хромосом 5А мягкой пшеницы

Локус	Положение	Локус	Положение
<i>Xgwm304</i>	5AS	<i>Xgwm156</i>	5AL
<i>Xgwm415</i>		<i>Xgwm595</i>	
<i>Xgwm154</i>		<i>Xgwm186</i>	
<i>Xgwm205</i>		<i>Xgwm126</i>	
<i>Xgwm293</i>		<i>Xgwm291</i>	

Как видно из рис. 1 и табл. 2, отобранные микросателлитные локусы равномерно расположены в различных районах хромосом 5А. Все они представлены единичными копиями на соответствующей хромосоме. Для каждого локуса были подобраны соответствующие праймеры и оптимизированы условия проведения ПЦР: снижена концентрация праймеров до 2,5 пмоль на

реакцию, снижена концентрация дезоксирибонуклеотидфосфатов до 80 мкмоль на реакцию.

Полученные данные свидетельствуют о наличии межлинейного полиморфизма по локусам *Xgwm186* (рис. 2), *Xgwm291* (рис. 3), *Xgwm595* (рис. 4) у изучаемых генотипов пшеницы. Для остальных исследованных локусов полиморфизм выявлен не был.

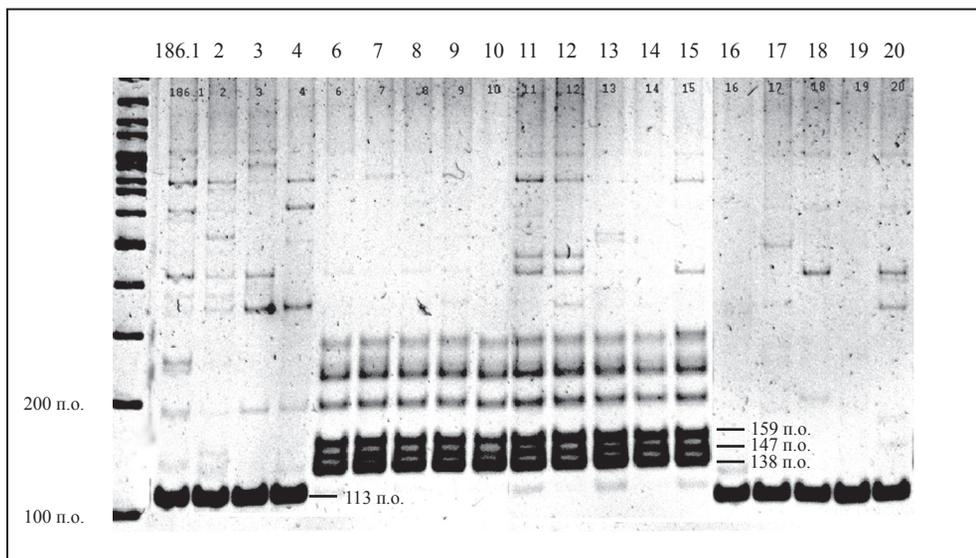


Рис. 2. Межлинейный полиморфизм по локусу *Xgwm186* у сортов и линий мягкой яровой пшеницы. 1–5 – Ростань, 6–10 – Рассвет, 11–15 – Dh 52-02-06, 16–20 – Dh 48-02-06

При изучении полиморфизма локуса *Xgwm186* у сорта Ростань и удвоенного гаплоида Dh 48-02-06 был выявлен фрагмент размером 113 п.о. У сорта Рассвет и удвоенного гаплоида Dh 52-02-06 выявлялось 3 фрагмента размером 159,

147 и 138 п.о. Полиморфизм по локусу *Xgwm291* проявился в наличии дополнительного фрагмента размером 139 п.о. у линий удвоенных гаплоидов, отсутствующего у исследованных сортов. Анализ полиморфизма локуса *Xgwm595* выявил

наличие 3 фрагментов у обоих исследованных сортов (размер 216, 199, 181 п.о.) и единственного фрагмента размером 302 п.о. для линий Dh

52-02-06 и Dh 48-02-06. Таким образом, из 10 исследуемых локусов на хромосоме 5А наличие полиморфизма было выявлено лишь по 3 из них.

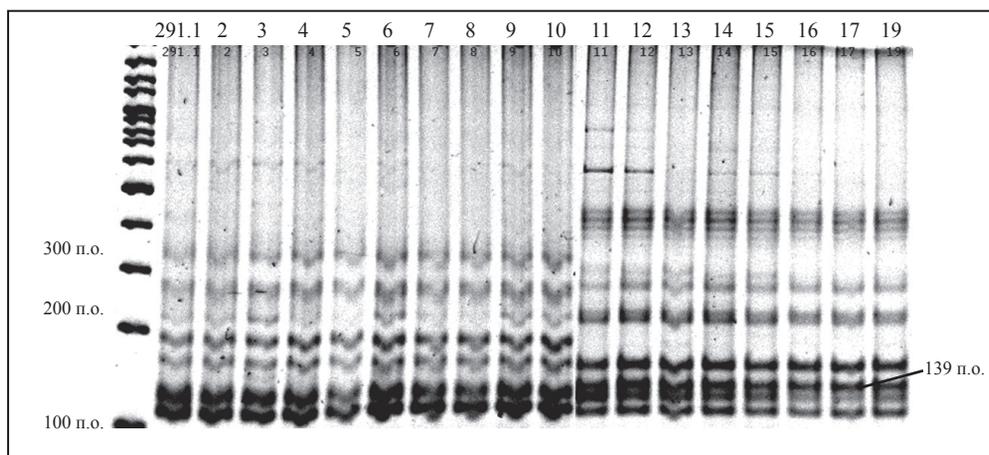


Рис. 3. Межлинейный полиморфизм по локусу *Xgwm291* у сортов и линий мягкой яровой пшеницы. 1–5 – Ростань, 6–10 – Рассвет, 11–15 – Dh 52-02-06, 16–20 – Dh 48-02-06

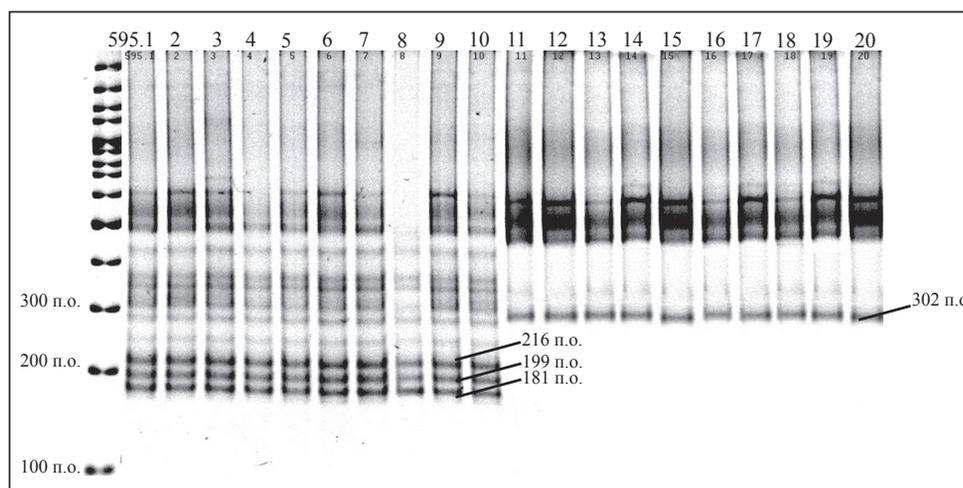


Рис. 4. Межлинейный полиморфизм по локусу *Xgwm595* у сортов и линий мягкой яровой пшеницы. 1–5 – Ростань, 6–10 – Рассвет, 11–15 – Dh 52-02-06, 16–20 – Dh 48-02-06

Гексаплоидное тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.) является синтетическим амфидиплоидом ($2n=6x=42$, AABBRR), полученным в результате скрещивания твердой пшеницы (*T. durum* L.) с рожью (*Secale* sp.). Одной из трудно решаемых задач селекции тритикале является повышение пластичности культуры. У тритикале нет естественных центров происхождения, где можно было бы черпать исходный материал для селекции по улучшению этой культуры, поэтому первоочередной задачей в селекции является увеличение генетического разнообразия тритикале. Методика культуры пыльников эффективно справляется с данной

задачей, но, как и большинство злаков, тритикале характеризуется очень низкой эффективностью пыльцевого эмбриогенеза *in vitro*. Информация по генетическому контролю данного процесса у тритикале практически отсутствует, так как тритикале в эволюционном отношении еще очень молодая культура и многие вопросы ее биологии и генетики недостаточно изучены. Однако, поскольку 2/3 генома тритикале представлено геномом пшеницы (AABB), а данные литературы свидетельствуют о том, на эффективность пыльцевого эмбриогенеза у пшеницы влияют в основном гены, расположенные на хромосомах А и В геномов [11, 21–23], пред-

ставляется вполне возможным использование подобранных для пшеницы SSR-маркеров при изучении генома тритикале.

Изучен полиморфизм локусов *Xgwm186*, *Xgwm595*, *Xgwm291*, расположенных на хромосоме 5А пшеничного генома у 74 генотипов (65 отдаленных гибридов и 6 родительских форм (пшеница: Рассвет, Р-2, Р-19; тритикале: Лана, Лотас, КСИ 18/05)). Установлено, что по локусу *Xgwm595*, полиморфному у исследован-

ных генотипов пшеницы, у изучаемых форм тритикале полиморфизм отсутствует. Анализ локуса *Xgwm291* выявил крайне высокую степень полиморфизма у исследуемых генотипов, что затрудняет интерпретацию полученных результатов. Только анализ полиморфизма локуса *Xgwm186* позволил получить результаты, сопоставимые с полученными при исследовании генома пшеницы. Полученные данные представлены на рис. 5.

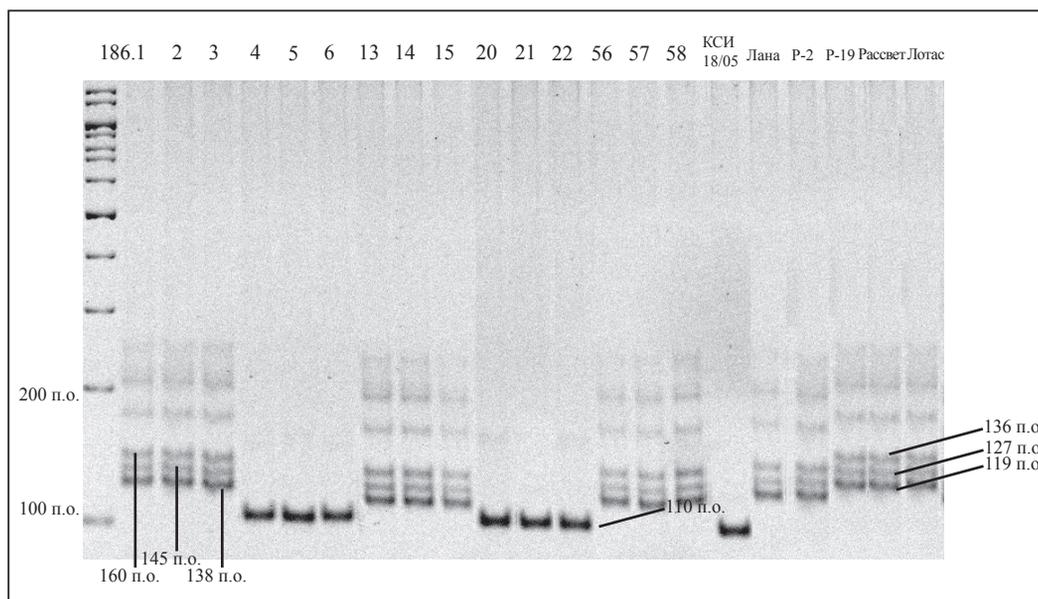


Рис. 5. Полиморфизм по локусу *Xgwm186* у форм тритикале и пшеницы
1–3 – Лотас × Р-2 (F_4), 4–6 – КСИ 18/05 × Ростань (F_4), 13–15 – Лана × Р19 (F_5), 20–22 – КСИ 18/05 × Ростань (F_5), 56–58 – Лотас × Рассвет (F_4).

По результатам исследования изученные генотипы разделились на 3 группы: у гибрида Лотас × Р-2 (F_4), а также сортов Рассвет, Лотас и сортообразца Р-19 выявлялось 3 фрагмента размером 160, 145 и 138 п.о. У сортообразца КСИ 18/05 и гибридов с его участием (КСИ 18/05 × Ростань F_4 и F_5) обнаружен единственный фрагмент размером 110 п.о. Размеры полученных фрагментов согласуются с данными по

полиморфизму этого локуса, полученными нами для пшеницы. Разница в размерах аналогичных фрагментов у пшеницы и тритикале не превышает 2 нуклеотида и может быть объяснена погрешностями при вычислении молекулярного веса фрагментов. Третью группу составили гибриды Лана × Р-19, Лотас × Рассвет, сорт Лана, сортообразец Р-2. У данных генотипов были выявлены 3 фрагмента размером 136, 127 и 119 п.о.

Заключение

Таким образом, анализ полученных данных показал наличие полиморфизма по 3 из 10 исследуемых локусов для изученных генотипов мягкой яровой пшеницы (*Xgwm186*, *Xgwm595*, *Xgwm291*). Поскольку данные генотипы являются контрастными по эффективности пыльцевого эмбриогенеза *in vitro* (сорта обладают низкой отзывчивостью, линии – высокой), мож-

но говорить о том, что наличие определенных локусов может коррелировать с отзывчивостью генотипов в культуре *in vitro*.

Показано, что праймеры пшеницы могут использоваться для оценки полиморфизма у тритикале. В частности, у исследованных нами генотипов тритикале сходные с пшеницей фрагменты обнаружены для локуса *Xgwm186*.

Список использованных источников

1. Высоцкая, И.Б. Культура пыльников *in vitro* в селекции тритикале: автореф. дис. ... канд. биол. наук / И.Б. Высоцкая. – Ставрополь, 2002. – 20 с.
2. Беккужина, С.С. Экспериментальный андрогенез и клеточная селекция пшеницы на устойчивость к стрессам: автореф. дис. ... канд. биол. наук. / С.С. Беккужина. – М., 1993. – 19 с.
3. Орлов, П.А. Функциональная геномика морфогенеза / П.А. Орлов. – Минск: Право и экономика, 2005. – 518 с.
4. Картель, Н.А. Биотехнология в растениеводстве / Н.А. Картель, А.В. Кильчевский. – Минск, 2005. – 310 с.
5. Vohra, P. Triticale: An alternative cereal grain in broiler starter diets / P. Vohra [et al.] – Calif. Agric. – 1991. – V. 45. – P. 34–37.
6. Круглова, Н.Н. Эмбриогенез как путь морфогенеза в культуре изолированных пыльников злаков / Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Т.Е. Батыгина // Успехи совр. биологии. – 1995. – Т. 115, вып. 6. – С. 692–705.
7. Korzun, V. Cereals breeding and genomics – bridging together / V. Korzun // Intern. sci. conf. Molecular genetics, genomics and biotechnology: Proceedings. – Minsk, 2004. – P. 18.
8. Белинская, Е.В. Наследование способности к андрогенезу *in vitro* у ярового ячменя / Е.В. Белинская // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 2. – С. 27–37.
9. Foster, B.P. Haploidy in barley / B.P. Foster, W. Powell // Opportunities and problems in plant biotechnology; Eds W. Powell, J.M. Hilman. – Washington: Washington State Univ., 1998. – P. 99–115.
10. Tuveesson, K.D. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture / K.D. Tuveesson, S. Pedersen, S.B. Andersen. – Theor. Appl. Genet. – 1989. – V. 78. – P. 879–883.
11. Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. / S. Agache [et al.] – Theor. Appl. Genet. – 1988. – V. 77. – P. 7–11.
12. Адонина, И.Г. Характеристика сателлитных повторов видов *Aegilops* L. секции *Sitopsis* и их использование в качестве молекулярных маркеров: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / И.Г. Адонина. – СО РАН, Новосибирск, 2007. – 19 с.
13. Wheat microsatellites in plant breeding-potential and implications. In: Molecular markers in plant breeding / M.S. Röder [et al.] – Springer-Verlag Heidelberg. – P. 255–266.
14. Tautz, D. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation / D. Tautz, M. Trick, G.A. Dover // Nature. – 1986. – V. 322. – P. 652.
15. The Effective Mutation Rate at Y Chromosome Short Tandem Repeats, with Application to Human Population-Divergence Time / L.A. Zhivotovsky [et al.] – Am. J. Hum. Genet. – 2004. – V. 74. – № 1. – P. 50.
16. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence / Jin L. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 1996. – V. 93. – № 26. – P. 15 285.
17. Глазко, В.И. Современные направления использования ДНК технологий / В.И. Глазко, Н.Н. Доманский, А.А. Созинов // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32, № 5. – С. 80–93.
18. Дорохов, Д.Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д.Б. Дорохов, Э. Клоке // Генетика. – 1997. – Т. 33. – № 4. – С. 443–450.
19. GrainGenes 2.0: a data base for Triticaceae and Avena [Electronic resource] – Mode of access: <http://wheat.pw.usda.gov>. – Date of access: 26.09.2012.
20. Linkage mapping of mutant loci in rye (*Secale cereale* L.) / S. Malyshev [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2001. – V. 103. – P. 70–74.
21. Henry, Y. Genetic analysis of *in vitro* wheat somatic embryogenesis. / Y. Henry, J. Buyser, L. Marcotte // Euphytica. – 1985. – V. 63. – № 3. – P. 265–270.
22. Ghaemi, M. Reciprocal substitution analysis of embryo induction and plant regeneration from anther culture in wheat / M. Ghaemi, A. Sarrafi, R. Morris // Genome. – 1995. – V. 38. – P. 158–165.
23. In vitro androgenesis of wheat: from fundamental to practical application / B. Barnabas [et al.] // Euphytica. – 2001. – V. 119. – P. 211–216.
24. Bregitzer, P. Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley callus / P. Bregitzer, R.D. Campbell // Crop Science. – 2001. – V. 41. – P. 173–179.

25. Construction of a genetic map of barley (*Hordeum vulgare* L.) cross 'Azumamugi' x 'Kanto Nakate Gold' using a simple and efficient amplified fragment-length polymorphism system / Y. Mano [et al.] // *Genome*. – 2001. – V. 44. – P. 284–292.
26. Torp, A.M. Chromosomal region associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture / A.M. Torp, A.L. Hansen, S.B. Andersen // *Euphytica*. – 2001. – V. 119. – P. 377–387.
27. Хлесткина, Е.К. Геномная локализация и структурно-функциональные особенности генов биосинтеза флавоноидов пшеницы и ее сородичей: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.02.07 / Е.К. Хлесткина. – СО РАН, Новосибирск, 2011. – 33 с.

Дата поступления статьи 1 июля 2013 г.

Н.Б. Белько¹, И.С. Гордей¹, И.А. Гордей¹, Э.П. Урбан²

ДУПЛИКАЦИЯ ГЕНОМА ОЗИМОЙ РЖИ (*SECALE CEREALE* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗАКИСИ АЗОТА (N₂O)

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
²РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию»,
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Введение

Дупликация генома (полиплоидизация) и отдельных генов является основным источником новых генов (аллелей) и важнейшим фактором эволюции генома. Дупликация генома – больше, чем простое удвоение числа хромосом в геноме, она включает комплекс молекулярно-генетических процессов, ведущих к геномным перестройкам.

Интерес к изучению проблем, связанных с полиплоидией резко возрос начиная с 2000 года [1]. На основании анализа данных, полученных в результате секвенирования геномов, представления о роли полиплоидии в эволюции претерпели существенные изменения. Полиплоидизация наряду с сегментной дупликацией хромосом рассматривается в настоящее время в качестве основного фактора в эволюции генома высших растений и некоторых позвоночных животных [2, 3]. Доля цветковых растений, претерпевших полиплоидизацию в процессе эволюционного развития, составляет более 50% [4], также он повторялся в филогенезе многих растений [5–7]. Установлено, что полиплоидия имела место в течение ранней эволюционной истории всех эукариот, а виды, ранее считавшиеся диплоидными, являются древними полиплоидами (палеополиплоидами), возникшими в результате дупликации геномов [8, 9]. Особенно часто полиплоидные роды и виды встречаются в ботанических семействах гречишных, толстянковых, розоцветных, мальвовых и злаковых.

Для генетики и селекции растений экспериментальная полиплоидия важна в решении следующих проблем:

- повышение продуктивности и адаптивности растений;
- расширение генетического разнообразия;
- индуцирование самосовместимости у самонесовместимых видов;

- преодоление межвидовой и межродовой нескрещиваемости;
- восстановление плодовитости у межвидовых и межродовых гибридов;
- закрепление гетерозиса;
- выявление происхождения и ресинтеза видов для создания более совершенных сортов.

В существующей в настоящее время структуре посевных площадей тетраплоидная рожь в Республике Беларусь занимает 430,0 тыс. га, что составляет 65% [10]. Однако следует признать, что практические результаты по применению полиплоидии в селекции озимой ржи значительно ниже ожидаемых и ее потенциальные возможности еще не раскрыты, по сравнению с результатом, достигнутым природой в эволюции растений.

Использование широко известного алкалоида колхицина (C₂₂H₂₅O₆) для получения тетраплоидных форм ржи оказалось сравнительно низкоэффективным. Выход тетраплоидов при обработке растений ржи колхицином составлял в среднем 0,5–4,0% [11–13]. У ржи перевод единичных растений на тетраплоидный уровень недостаточен. Биологические особенности культуры в связи с перекрестным способом опыления требуют массового получения тетраплоидных растений, что позволяет сохранить гетерозиготность исходных популяций [10]. Кроме того, колхицин угнетает растения и обладает мутагенными свойствами, что значительно снижает результативность метода и ценность полученных полиплоидов [14, 15].

Полиплоидия – важнейший источник генетической изменчивости и должна шире использоваться для создания исходного материала и селекции новых сортов. По мнению многих исследователей, задачу по созданию устойчивых к полеганию сортов ржи легче решить на

тетраплоидном уровне, поскольку данные формы имеют более прочный и несколько укороченный по сравнению с диплоидами стебель. с помощью полиплоидии можно избавиться от мелкозерности, которая коррелирует с короткостебельностью на диплоидном уровне [16].

Полиплоиды также представляют значительный интерес в плане использования у озимой ржи гетерозиса. Они позволяют закрепить его на более продолжительное, чем у диплоидов время [17, 18]. Замедление падения гетерозиса у тетраплоидов связано с более продолжительным выщеплением гомозигот во втором и последующих поколениях [18], а также полиаллель-

ными взаимодействиями генов, в результате чего в отличие от диплоидов максимальным гетерозисом обладают двойные гибриды [19, 20].

Создание новых тетраплоидных форм озимой ржи на генетической основе современных диплоидных сортов и гибридов существенно расширит генофонд культуры, а молекулярно-цитогенетическое исследование созданных тетраплоидов с использованием современных методов анализа чрезвычайно важно в связи с функционированием полиплоидного генома, выявлением эффектов дупликации генома, и рациональным использованием созданного исходного материала в практической селекции.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили новые диплоидные сорта и гибриды (RR, $2x = 14$) и созданные на их основе тетраплоидные формы (RRRR, $4x = 28$) озимой ржи (*Secale cereale* L.). Тетраплоиды ржи получали с использованием в качестве полиплоидизирующего реагента закиси (оксида) азота (N_2O), химически инертного газа в нормальных условиях [21]. Цитологический анализ числа хромосом, ключевых этапов микроспорогенеза и определение фертильности пыльцы проводили на давленных препаратах апикальных меристем корня и пыльниках, окрашенных 2%-ным раствором ацетокармина в 45%-ной уксусной кислоте. Анализ хромосомного состава ди- и тетраплоидных форм

проводили с применением модифицированного С-метода дифференциального окрашивания хромосом ржи (С-бэндинг) [22]. Электрофорез запасных белков семян (секалинов) проводили в полиакриламидном геле в вертикальных пластинах электрофоретической камеры «VE-4M», производства ООО «Биоклон» по методическим указаниям ВИР [23]. Специфичность геномов диплоидной и тетраплоидной озимой ржи на уровне ДНК устанавливали ПЦР-анализом с произвольными праймерами (RAPD-анализ). ДНК выделяли с помощью Genomic DNA Purification Kit (Fermentas). В качестве маркера молекулярного веса использовали 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) [24].

Результаты и обсуждение

Нами усовершенствован метод и разработаны методические рекомендации по полиплоидизации генома ржи с использованием закиси азота (N_2O) применительно к современным сортам и гибридам диплоидной озимой ржи [25]. Схема создания тетраплоидов ржи (RRRR, $4x = 28$) и параметры обработки диплоидных растений закисью азота приведены на рис. 1. В табл. 1 представлены данные по результативности данного метода полиплоидизации растений. Так, завязываемость зерен у обработанных закисью азота растений ржи варьировала от 11,1 до 52,3% и составляла в среднем 23,9%.

Зерна сравнительно мелкие (14,5–27,8 г) и характеризуются пониженной жизнеспособностью. Всхожесть их варьировала от 8,4 до 75,0% и зависела от сорта или гибрида диплоидной ржи.

Сравнительно низкая фертильность цветков при искусственном опылении и обработке рас-

тений азота закисью может быть обусловлена следующими факторами:

- повреждением завязей при механической кастрации цветков;
- часть цветков может быть не опылена в результате искусственного опыления;
- гибелью зигот в атмосфере азота закиси под давлением.

Основной причиной пониженной массы 1000 зерен и сравнительно низкой жизнеспособности семян является физиологическая незрелость образовавшихся зерновок вследствие нарушения питания из-за пересадки растений при обработке закисью азота. Сортные различия по всхожести семян обусловлены генотипической специфичностью сортов формировать жизнеспособные зерновки после воздействия на растения закиси азота.



Рис. 1. Схема создания тетраплоидных форм озимой ржи (RRRR, 4x = 28) с использованием закиси азота (N₂O)

Анализ числа хромосом у проростков показал, что доля тетраплоидов варьировала от 3,9 до 85,7% в зависимости от сорта и продолжительности периода «от опыления пылью колосьев растений до начала обработки их закисью азота» (табл. 1). Так, у гибрида F₁ Плиса получено 85,7% полиплоидных проростков после обработки растений закисью азота спустя 17 часов после опыления их колосьев. С увеличением продолжительности этого периода до 19 часов, выход тетраплоидных проростков снизился до 27,5%, т.е. больше чем в 3 раза. В то же время обработка закисью азота растений сорта Юбилейная спустя 17 часов после опыления позволила получить лишь 19,7% тетраплоидов. С увеличением продолжительности этого периода до 19 часов доля те-

траплоидов у сорта Юбилейная повысилась до 23,1%. Установлено [25, 29], что первое митотическое деление зиготы у озимой ржи в зависимости от сорта наступает через 17–19 часов после опыления.

Использование закиси азота в качестве вещества, удваивающего число хромосом, основано на ингибировании формирования веретена первого деления зиготы в митозе. При проникновении в клетку закиси азота веретено деления не формируется, вследствие чего в первом митотическом делении зиготы не происходит расхождение хромосом. Показано, что закись азота влияет на белки, активирующие или репрессирующие гены митоза [26]. Причем это влияние осуществляется не только на уровне транскрипции, но и на уровне трансляции, т.е. на уровне рибосом.

Таблица 1

Эффективность полиплоидизации растений диплоидных сортов озимой ржи закисью азота (N₂O)

Диплоидная рожь	Время экспозиции, ч	Завязываемость зерен, %	Масса 1000 семян, г	Всхожесть, %	Выход тетраплоидных проростков, %
Алькора	17,5	23,7	27,2	57,9	3,9
	18	22,3	26,3	51,8	34,0
Заречанская зеленоукосная	17	18,0	14,5	42,9	15,7
Юбилейная	17	14,4	21,4	44,6	19,7
	19	15,1	20,8	29,5	23,1
Зарница	17	52,3	20,5	48,1	83,7
Диамант	17,5	18,6	26,2	29,4	48,9
F ₁ Плиса	17	31,7	27,8	42,0	85,7
	17,5	26,4	26,8	50,6	52,4
	19	28,1	26,0	75,0	27,5
F ₁ Валдай × Каупо	16	11,1	20,3	20,8	43,7
DC-2	17,5	21,5	13,2	8,4	82,5
Среднее		23,6	22,6	41,8	43,4

Закись азота может подавлять ферменты, ответственные за синтез ДНК. Сорта ржи существенно различаются по продолжительности периода покоя зиготы. Исходя из полученных данных, у одних сортов диплоидной ржи первое митотическое деление зиготы происходит через 17 часов после оплодотворения, у других продолжительность этого периода достигает 24 часов. Поэтому различия у сортов ржи по эффективности полиплоидизации растений закисью азота обусловлены определением времени «от опыления цветков до начала деления зигот», что является определяющим фактором эффективности удвоения числа хромосом. На эффективность данного метода может оказывать влияние генотипическая специфичность сортов

ржи сохранять жизнеспособность зигот в закиси азота, а также их способность к удвоению числа хромосом в первом делении зигот.

Проведено изучение мейоза, хромосомного состава потомства и фертильности созданных тетраплоидных форм ржи.

Нарушения мейоза, наблюдаемые в материнских клетках микроспор в первом и втором мейотических делениях у тетраплоидов и диплоидов ржи, аналогичны. Однако у тетраплоидов мейоз протекал с большими нарушениями (табл. 2). Среди хромосомных ассоциаций преобладали биваленты, со значительной частотой встречались уни-, три- и квадриваленты, число которых на клетку варьировало.

Таблица 2

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

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

Продолжение табл. 2

Сорта и формы	Метафаза I	Анафаза I	Метафаза II	Анафаза II	Тетрады
Диплоидные сорта (RR, 2n = 14)					
Плиса	3,1	1,7	1,6	2,1	0,9
Юбилейная	2,5	2,2	1,2	2,9	0,5
Зарница	3,3	1,8	1,1	2,5	1,0
Алькора	1,2	1,6	1,9	2,1	0,7
Среднее	2,5	1,8	1,5	2,4	3,1

* – Различия достоверны при $P < 0,05$.

У тетраплоидов в отличие от диплоидов в метафазе I достаточно часто (от 7,9 до 19,2%) встречались микроспороциты с унивалентными хромосомами. У диплоидных форм они составили 1,2–3,3%.

В анафазе I в среднем количество МКП с нарушениями у тетраплоидных форм составило 9,9%, у диплоидных – 1,8%. Наиболее типичным нарушением для этой стадии мейоза является образование анафазных мостов.

Во втором мейотическом делении нарушения встречались чаще, чем в первом, и частота их достоверно ($P < 0,05$) выше у тетраплоидов по сравнению с диплоидами. В среднем в метафазе II у тетраплоидных форм количество аномальных МКП составило 22,2%, у диплоидных

сортов – 1,5%. В анафазе II количество МКП с нарушениями у тетраплоидных форм находилось на уровне 19,1%, у диплоидных – 2,4%.

Удвоение хромосом приводит к нарушению сбалансированной системы взаимодействия генов контроля мейоза [27, 28]. В настоящее время картирован ряд мейотических мутаций (sy1, sy9, sy10, sy18, sy19), контролирующих отдельные этапы процесса мейоза у озимой ржи.

Результаты цитологического анализа созданных тетраплоидных форм ржи показали относительно низкий уровень формирования (до 8,1%) анеуплоидных растений, что свидетельствует об эффективности дупликации генома ржи в первом делении зиготы (табл. 3).

Таблица 3

Содержание анеуплоидных растений у созданных тетраплоидных форм озимой ржи

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

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

идных растений (28 хромосом + фрагмент хромосомы) отмечено в 3,3% случаев у тетраформ Зарница и Плиса. Наибольшей стабильностью хромосомного состава из исследованных тетраформ озимой ржи характеризовалась Юбилейная, тогда как Плиса содержала максимальное количество анеуплоидных растений.

Выщепление анеуплоидов в потомстве экспериментально полученных тетраплоидов свя-

зано с «реверсией плоидности», обусловленной нарушениями в мейозе. У полиплоидных видов злаков количество анеуплоидных особей с различными числами хромосом может составлять до 14%. У тетраплоидной ржи число анеуплоидов составляет в среднем 15–30%.

Генотипическая специфичность созданных полиплоидных форм ржи по содержанию анеуплоидов обусловлена следующими факторами:

- ранним (С₁) поколением потомства анализируемых тетраплоидных форм;
- разным уровнем нарушений в мейозе у исходных диплоидных сортов и созданных на их основе ауотетраплоидов;

- уровнем стабильности полиплоидных геномов;
- гибелью анеуплоидов с числом хромосом значительно отклоняющимся от эуплоидного в результате зиготической селекции;
- отсутствием мутагенного эффекта закиси азота при полиплоидизации растений.

Проведен сравнительный анализ кариотипов созданных тетраплоидов с использованием С-метода дифференциального окрашивания хромосом. Установлено, что 28-хромосомные растения являлись геномно сбалансированными тетраплоидами (RRRR, $4x = 28$) и не содержали видимых структурных изменений хромосом (рис. 2).

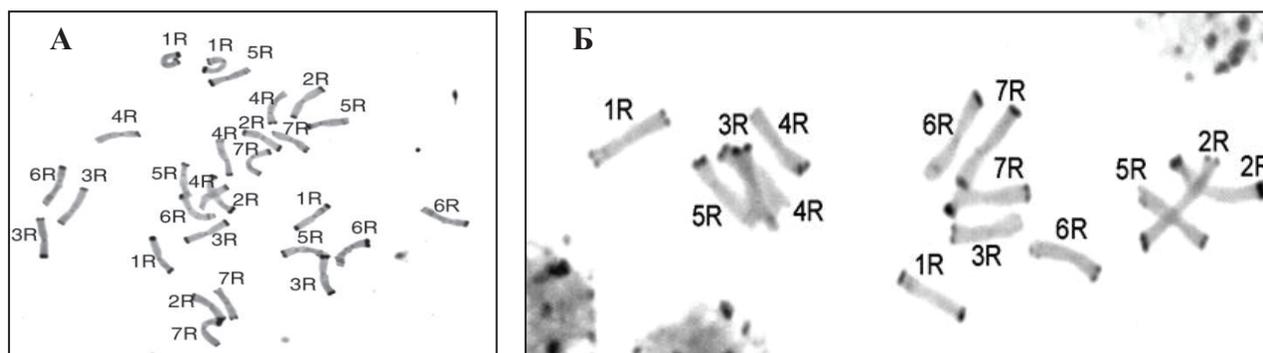


Рис. 2. Кариотипы озимой ржи Алькора: а – тетра-форма, б – исходная диплоидная форма

Главным недостатком экспериментально полученных полиплоидов, существенно ограничивающим использование их в селекции, является пониженная семенная продуктивность. Эта особенность полиплоидов представляет серьезное препятствие в селекционной работе с ними, за исключением вегетативно размножаемых форм и тех редких случаев, когда бессемянность является желательным товарным признаком.

Фертильность пыльцы у полученных тетраформ ржи составляла от 29,1 до 43,3%, что существенно ниже по сравнению с ди- и тетраплоидными сортами озимой ржи. Рожь отличается довольно высокой пыльцевой фертильностью (в среднем 92–98% у диплоидов и 86–87% у коммерческих тетраплоидных сортов). Озерненность колоса у тетраформ варьировала от 32,9 до 46,7% и оказалась ниже на 15,9–22,9% этого же показателя у диплоидного сорта ржи Павлинка.

Пониженная фертильность тетраплоидов ржи обусловлена гаметической и зиготической стерильностью. В гаметической стерильности различают пыльцевую стерильность, стериль-

ность макроспор и зародышевых мешков. Несмотря на частичную пыльцевую стерильность, у тетраплоидов достаточно образующейся фертильной пыльцы для того, чтобы обеспечить нормальное опыление [10]. Следовательно, стерильность пыльцы не оказывает существенного влияния на озерненность растений или это влияние незначительно. Нарушения в макроспорогенезе и макрогаметогенезе, приводящие к частичной деградации или неполноценности макроспор и зародышевых мешков, непосредственно снижают озерненность.

Для выявления различий в экспрессии генетических систем геномов новых тетраплоидных форм озимой ржи в сравнении с исходными диплоидными сортами проводили электрофорез запасных белков секалинов семян. У исходных диплоидных сортов и созданных тетраплоидов ржи идентифицировано 66 типов спектра секалина, которые неравномерно распределены (от 7 до 19) и характеризуются специфическим составом для каждого сорта и тетраплоидной формы (табл. 4).

Таблица 4

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

Диплоидные сорта и тетраплоидные формы	Состав и интенсивность полипептидов секалина		
	β	γ	ω
Зарница (RRRR, 2n = 28)	$\underline{12345}$	$\overline{45}$	$\underline{2345} \overline{78910111213}$
Зарница (RR, 2n = 14)	$\underline{2345}$	$\overline{5}$	$\underline{234} \overline{7891011}$
Юбилейная (RRRR, 2n = 28)	$\overline{12345}$	$\overline{1} \overline{45}$	$\overline{123456789101112}$
Юбилейная (RR, 2n = 14)	$\underline{2345}$	$\overline{5}$	$\underline{234} \overline{78} \underline{1011}$
Алькора (RRRR, 2n = 28)	$\underline{2345}$	$\overline{5}$	$\overline{1234} \overline{67891011}$
Алькора (RR, 2n = 14)	$\underline{2345}$	$\overline{1}$	$\overline{1234} \overline{7891011}$
Плиса (RRRR, 2n = 28)	$\underline{2345}$		$\overline{1234} \overline{678910111213}$
Плиса (RR, 2n = 14)	$\underline{2345}$		$\underline{234} \overline{7891011}$

Установлено, что наибольшей изменчивости подвержены компоненты ω -зоны. У ряда генотипов отмечена элиминация компонентов ω 7, ω 11, ω 12, проявление ω 1 и ω 6. В β -зоне часто происходит элиминация компонентов β 1, β 2 и β 3. Внутрисортовой полиморфизм ЭФ-спектров секалина у тетраплоидных форм значительно шире и достигает 10–19, у исходных диплоидных сортов – от 7 до 10 типов спектра. В электрофоретическом спектре секалина большинства тетраплоидных генотипов появляются γ 4 и γ 5 компоненты, отсутствующие у исходных диплоидных сортов, а компонент γ 1, присущий исходному диплоидному гибриду, может быть элиминирован у полученного тетраплоида. У ряда тетраплоидов наблюдается появление в ЭФ-спектре компонентов ω 1213, не выявленных у исходных диплоидов.

С целью выявления изменений, произошедших в результате дупликации генома на уровне ДНК, проведен RAPD-анализ ДНК тетраплоидных форм и исходных диплоидных сортов озимой ржи. У исследуемых сортов и форм ди- и тетраплоидной ржи выявлено по 66 фрагментов ДНК соответственно. Число амплифицированных фрагментов ДНК (ампликонов) в

суммарной выборке растений варьировало от 6 до 12 в зависимости от праймера, их размер составлял от 300 до 3000 п.н. Из 8 праймеров наиболее эффективными для озимой ржи оказались ОРА 5 и Р 36. На рис. 3 представлен спектр амплифицированных фрагментов ДНК растений ди- и тетраплоидной ржи с использованием праймера ОРА 5. В изученных ди- и тетраплоидных популяциях выявлено 10 и 11 фрагментов ДНК соответственно. Электрофоретический анализ амплифицируемых фрагментов ДНК созданных тетраплоидов в сравнении с их исходными диплоидными сортами выявил в спектрах существенные различия в 70% случаев. У тетраплоидов в 25% спектров обнаружено появление 1–3 фрагмента ДНК размером от 300 до 4000 п.н., отсутствующих у исходных диплоидных сортов. RAPD-анализ выявил у тетраплоидов потерю (20%) или одновременно потерю и появление (30%) отдельных полиморфных фрагментов ДНК. Чаще элиминировали фрагменты ДНК размером от 700 до 1700 п.н.

Полученные результаты свидетельствуют об изменениях генома ржи при дупликации, которые обусловлены структурными измене-

ниями ДНК, дифференциальной элиминацией последовательностей, метилированием ДНК и диверсификацией генов, перегруппировкой и блочными перестройками.

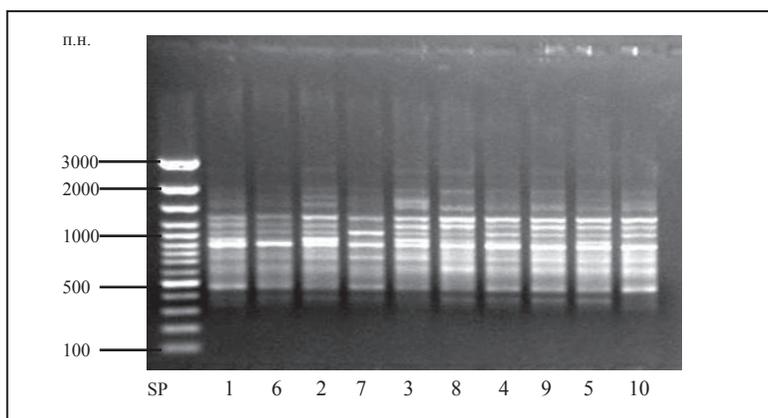


Рис. 3. RAPD-спектр амплифицированных фрагментов ДНК растений ди- (1 – Алькора, 2 – Плиса, 3 – Зарница, 4 – Юбилейная, 5 – Заречанская зеленоукозная) и тетраплоидной (6 – Алькора-тетра, 7 – Плиса-тетра, 8 – Зарница-тетра, 9 – Юбилейная-тетра, 10 – Заречанская зеленоукозная-тетра) озимой ржи, полученный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

SP – фрагменты ДНК с известным числом пар оснований

На генетической основе сортов и гибридов диплоидной ржи путем дупликации в зиготе их геномов с использованием закиси азота создано 8 тетраплоидных форм (Зарница, Юбилейная, Зареченская зеленоукозная, Алькора, Плиса, Валдай × Каупо, Диамант и ДС-2). С целью селекционной оценки созданные нами тетраплоиды ржи анализировали по степени выраженности важнейших хозяйственно-ценных признаков и урожайности в сравнении с исходными диплоидами и стандартом в селекционном питомнике и в мелкоделяночных посевах. По результатам комплексной оценки в качестве перспективных признаны Зарница, Юбилейная, Алькора-тетра и Зареченская зеленоукозная. Заречанская зеленоукозная-тетра характеризуется высокой интенсивностью весенней вегетации и представляет интерес в качестве исходного материала для создания сортов зеленоукосного направления. Для селекции сортов зернового направления наиболее подходят Зарница, Юбилейная, Диамант и Алькора, которые характеризуются выравниваемостью стеблестоя, высокой устойчивостью к болезням и короткостебельностью. На основе тетраплоидной формы Зарница нами совместно с РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» создан и передан в ГУ «Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений Республики Беларусь» сорт

тетраплоидной озимой ржи Фламинго (RRRR, $4x = 28$). Схема создания сорта Фламинго представлена на рис. 4.

Сорт продовольственного, технического и кормового назначения. Создан путем перевода диплоидного сорта Зарница (RR, $2x = 14$) на тетраплоидный уровень с последующими индивидуально-семейными отборами на высокий уровень озерненности колоса, устойчивость к снежной плесени, зимостойкость, продуктивность, устойчивость к предуборочному прорастанию и качество зерна. Сорт с рецессивным типом короткостебельности (hl), высота растений составляет 140–150 см. Сорт устойчив к полеганию (8–9 баллов), характеризуется высоким уровнем зимостойкости (87–95%). Масса 1000 зерен варьирует от 41,0 до 47,8 г, натура зерна – 660–690 г/л. Сорт Фламинго по урожайности зерна превышает стандарт (сорт Пуховчанка) в среднем на 2,9 ц/га за три года испытаний в питомниках КСИ.

Тетраплоидные формы Юбилейная, Алькора, Плиса, Валдай × Каупо, Диамант и ДС-2 включены в селекционный процесс. Проводится гибридизация их с другими сортами с целью создания оптимально сбалансированных генетических систем с новым сочетанием генов хозяйственно-полезных признаков.



Рис. 4. Схема создания сорта тетраплоидной ржи Фламинго

Заключение

Проведенные исследования позволяют заключить, что закись азота (N_2O) является высокоэффективным реагентом дупликации (полиплоидизации) генома сортов и гибридов диплоидной озимой ржи. При соблюдении оптимальных параметров обработки растений (давление в 6 атм, экспозиция растений в атмосфере N_2O составляет 24 ч и обработка растений в первом делении зиготы, т.е. через 17–19 ч после искусственного опыления) метод обеспечивает получение до 85,7% тетраплоидов. Эффективность метода определяется завязываемостью зерен у обработанных закисью азота растений, жизнеспособностью полученных семян и частотой тетраплоидных проростков. Образование тетраплоидов лимитируется в основном состоянием зигот в момент обработки растений закисью азота. Установлено [25, 29], что первое митотическое деление у озимой ржи в зависимости от сорта наступает через 17–19 часов после опыления. Показана генотипическая специфичность сортов и гибридов диплоидной озимой ржи по реакции растений на полиплоидизацию закисью азота, которая обусловлена:

- продолжительностью периода «от оплодотворения до начала деления зигот» у исследуемых сортов;
 - генотипической специфичностью сортов ржи сохранять жизнеспособность зигот в атмосфере закиси азота и после прекращения его воздействия;
 - разной способностью генотипов ржи к удвоению числа хромосом в первом делении зиготы под воздействием закиси азота.
- Дупликация генома у ржи приводит к нарушению генетической системы регуляции мейоза (*sy*), изменению экспрессии генов видоспецифических запасных белков семян (секалинов, *Sec*) и структурным изменениям ДНК, что оказывает влияние на проявление признаков и свойств у тетраплоидов. Индуцированные на основе высокопродуктивных диплоидных сортов и гибридов тетраплоиды ржи сравнительно цитологически стабильны, ценны для расширения генофонда культуры и являются новым исходным материалом для селекции. Путем индивидуально-семейных отборов на озерненность колоса, устойчи-

вость к болезням, зимостойкость, продуктивность и качество зерна на их основе можно создавать тетраплоиды с новым сочетанием генов хозяйственно-полезных признаков путем гибридизации и селективировать коммерческие сорта в сравнительно короткие сроки.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение изменения аллельного состава генов хозяйственно-полезных признаков при дупликации генома в связи с селекцией на продуктивность, устойчивость к полеганию, листовым болезням, прорастанию зерна в колосе и качество продукции.

Список использованной литературы

1. Першина, Л.А. Орлоидотдаленнойгибридизации и полиплоидии в эволюции растений / Л.А. Першина. – Вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13, № 2. – С. 336–344.
2. Ware, D. Comparison of genes among cereals / D. Ware, L. Stein // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2003. – V. 6. – P. 121–127.
3. Adams, K.L. Polyploidy and genome evolution in plants. / K.L. Adams, J.F. Wendel // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2005. – V. 8. – P. 135–141.
4. Ramsery, A. The effect of the wheat Ph1 locus on chromatin organization and meiotic chromosome pairing analyzed by genome painting / A. Ramsery // *Chromosoma.* – 1998. – V. 107, № 6. – P. 339–350.
5. Masterson, J. Stomatal Sire in Fossil Plants: Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms / J. Masterson // *Science.* – 1994 – V. 264. – P. 421–424.
6. Seoighe, C. Turning the clock back on ancient genome duplication / C. Seoighe // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2003. – V. 13. – P. 636–643.
7. Wendel, J.F. Genome evolution in polyploids / J.F. Wendel // *Plant Mol Biol.* – 2000. – V. 42. – P. 225–249.
8. Wolfe, K.N. Yesterday's polyploidization and mystery of diploidization / K.N. Wolfe // *Nat. Rev. Genet.* – 2001. – V. 2. – P. 333–341.
9. Widespread duplications throughout the history of flowering plants / L. Cui [et al.] // *Genome Res.* – 2006. – V. 16. – P. 738–749.
10. Урбан, Э.П. Озимая рожь в Беларуси: Селекция, семеноводство, технология возделывания / Э.П. Урбан. – Минск: Беларуская навука, 2009. – 269 с.
11. Врублевский, Л.А. К вопросу о методике получения тетраплоидов озимой ржи / Л.А. Врублевский, С.Д. Лаврукович // Тез. докл. III Всесоюзного совещания по полиплоидии. – Минск, 1970. – С. 35–36.
12. Тороп, А.А. Создание и отбор тетраплоидных форм озимой ржи / А.А. Тороп, Е.Б. Панина // Селекция и семеноводство. – 1971. – Т. 1. – С. 21–24.
13. Получение тетраплоидной озимой ржи от совместного действия колхицина и папаина / А.А. Морозов [и др.] // Труды. НИИСХ. Центр. р-нов Нечерноземной Зоны. – 1977. – Т. 41. – С. 42–44.
14. Петрушина, М.П. Митозные аномалии в тканях первичной меристемы у полиплоидной сахарной свеклы в S_0 и последующих генерациях / М.П. Петрушина // Вопросы генетики, селекции и цитологии сахарной свеклы. – Киев, 1971. – С. 110–115.
15. Давоян, Н.И. Диплоидизирующее и мутагенное действие колхицина / Н.И. Давоян, В.С. Тырнов // Гаплоидия у покрытосеменных растений. – Саратов, 1974. – С. 92–97.
16. Мухин, Н.Д. Эффективность метода полиплоидии в селекции озимой ржи на устойчивость к полеганию / Н.Д. Мухин, С.Д. Лаврукович // Земледелие и растениеводство в БССР: Сб. науч. тр. БелНИИЗК. – Минск, 1981. – Вып. 24. – С. 6–10.
17. Дубинин, Н.П. Генетика популяций и селекция / Н.П. Дубинин, Я.Л. Глембоцкий. – М., 1967. – 570 с.
18. Дубинин, Н.П. Теоретические вопросы и достижения при использовании полиплоидии в селекции растений / Н.П. Дубинин, В.К. Щербаков // Полиплоидия и селекция. – М.:Л., 1965. – С. 8–42.
19. Demarly, Y. Genetique des tetraploids et amelioration des plantes / Y. Demarly // *Ann. Amelir. Plantes.* – 1963. – Vol. 13, N 4. – P. 377–400.
20. Lundqvist, A. Heterosis and inbreeding depression in autotetraploidy rye / A. Lundqvist // *Heredity.* – 1966. – Bd. 56. N 2–3. – P. 317–366.
21. Бахарев, А.Л. Полиплоидизация озимой ржи закисью азота: автореф. дис. канд. биол. наук. / А.Л. Бахарев. – Харьков., 1983 г. – 20 с.

22. Бадаева, Е.Д. Изменение хромосом ржи в кариотипе тритикале: дис ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Е.Д. Бадаева. – М., 1984. – 181 с.
23. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / В.Г. Конарев [и др.]. – СПб, 2000. – С. 38–48.
24. Сиволап, Ю.М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю.М. Сиволап, Н.Э. Кожухова, Р.Н. Календарь. – Одесса: Астропринт, 2011. – С 49–74.
25. Методические рекомендации по полиплоидизации (дупликация генома) ржи (*S.cereale* L.) с использованием закиси азота (N_2O) / Н.Б. Белько, И.С. Гордей, И.А. Гордей // Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск: Право и экономика, 2012. – 28 с.
26. Kitamura, S. Mechanism of action of nitrous oxide gas applied as a polyploidizing agent during meiosis in lilies / S. Kitamura // Sex. Plant Reprod. 22 – 2009 – P. 9–14.
27. Соснихина, С.П. Изучение генетического контроля мейоза у ржи / С.П. Соснихина [и др.] // Генетика. – 1994. – Т. 30. – С 1043–1056.
28. Национальный Интернет-портал РФФИ [Электронный ресурс] / Книги, изданные при поддержке РФФИ – Режим доступа: <http://www.rfbr.ru/old/pub/knigi/janus/golub.htm>. – Дата доступа: 12.03.2010.

Дата поступления статьи 26 июня 2013 г.

В.А. Лемеш¹, М.В. Богданова¹, Е.В. Гузенко¹, З.Е. Грушецкая¹, В.И. Сакович¹, Т.Е. Саматадзе², О.А. Рачинская²,
О.В. Муравенко²

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ СОРТОВ ЛЬНА (*LINUM USITATISSIMUM* L.) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПЕРИОДА СЕЛЕКЦИИ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, Академическая, 27
²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН
Российская Федерация, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32

Введение

Древняя традиционная культура Беларуси – лен – принадлежит к одной из широко используемых сельскохозяйственных культур двойного назначения, волокно и масло которой находят применение в различных областях промышленности. Льняной агрономический комплекс Беларуси, с одной стороны, является источником сырья для текстильной и других отраслей промышленности, а с другой – обеспечивает валютные поступления за счет экспорта волокна. Одним из основных путей повышения валового сбора и улучшения качества льнопродукции является выведение и внедрение в производство новых высокопродуктивных, устойчивых к полеганию и болезням сортов льна-долгунца. Эксперты, тестирующие сорта льна по DUS-критериям (distinctness, uniformity and stability), отмечают, что морфологическая вариабельность новых сортов значительно снизилась [1], что указывает на узкую генетическую основу современных сортов. В связи с этим необходим поиск новых источников генетического разнообразия для включения их в селекционный процесс. Необходимо создавать новый исходный материал с помощью современных методов и технологий, а также использовать сорта народной селекции и местные примитивные образцы (ландрасы) в качестве источников генетического разнообразия. Известно, что стародавние сорта и местные формы сельскохозяйственных растений в результате длительного естественного и искусственного отбора лучше других приспособлены к локальным условиям произрастания и отличаются оптимальной для данной местности длиной вегетационного периода. Изучение местных сортов важно для геногеографических исследований, так как позволяет

не только получить представление об основных характеристиках аборигенного материала того или иного вида, но и восстановить его филогенетические связи [2].

Молекулярные маркеры являются эффективным средством оценки генетического разнообразия внутри и между популяциями растений, т.к. дают возможность проанализировать большое количество локусов в геноме. Для генетической оценки ресурсов льна разработаны различные приемы молекулярного маркирования, такие, как метод маркирования генетического материала путем амплификации ДНК с произвольными праймерами (RAPD) [3, 4], полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP) [5], полиморфизм длин продуктов амплификации (AFLP) [6] и SSR-анализ [7–9], основанный на полиморфизме микросателлитных последовательностей. Однако применение некоторых типов маркеров (RAPD, RFLP и AFLP) затруднено, что связано либо с их слабой воспроизводимостью (RAPD), либо трудоемкостью процедуры анализа (RFLP и AFLP). Кроме того, лен принадлежит к числу видов с низким уровнем полиморфизма. Это является следствием как самоопыления, так и ограниченного числа исходных форм для скрещивания, используемых при создании современных сортов. Выявить генетическое разнообразие и установить уровень генетической изменчивости исходного и селекционного материала льна возможно с помощью гипервариабельных микросателлитов, которые представляют собой универсальную систему генетических маркеров для анализа наследуемых изменений на уровне ядерной ДНК и широко используются в исследованиях генетического полиморфизма растений. Высо-

кий уровень полиморфизма микросателлитов, относительно равномерное их распределение в эухроматиновой части генома и широкая распространенность сделали их чрезвычайно популярными в исследованиях генетического разнообразия [10].

До настоящего времени на белорусских сортах льна не проводилось никаких серьезных исследований генетического разнообразия, поэтому неизвестно, насколько ограничена генетическая база белорусских селекционных программ и произошла ли сколько-нибудь значительная генетическая эрозия в течение селекционного процесса. К тому же реестр родительских сортов неполон, генетическое

родство между некоторыми внедренными сортами остается неизвестным. Отсутствие генетических исследований сортов льна с использованием генетических маркеров затрудняет селекционерам расширение генетического базиса селекционного материала, используемого ими для устойчивого улучшения льна.

Целью данного исследования было сравнительное изучение генетического полиморфизма сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси с белорусскими стародавними местными сортами и примитивными образцами (ландрасами) в зависимости от периода селекции с использованием микросателлитных маркеров.

Материалы и методы

Материал исследования был представлен выборкой из 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси, включающей 3 сорта льна масличного и 36 сортов льна-долгунца, а также выборкой из коллекционных 15 стародавних белорусских образцов льна, заложенных в коллекцию в 20–50-х годах XX столетия, полученных из ВИР им. Н.И. Вавилова.

ДНК выделяли из листьев 4-х недельных проростков индивидуальных растений с использованием Genomic DNA Purification Kit (#K0512 Fermentas). Анализ полиморфизма микросателлитов проводили с использованием ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами [7, 8]. Так как в двух работах разные праймеры имели одинаковые названия (Lu), праймерам Deng X. et al. [8] были даны названия Flu.

Реакционная смесь включала 20 нг геномной ДНК, по 0,25 мкМ прямого и обратного праймера, 200 мкМ каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, от 1,5 до 2,5 мМ MgCl₂ и 1 единицу Taq-полимеразы в инкубационном буфере. ПЦР проводили в амплификаторе BioRad в

следующих условиях: 94 °С в течение 5 мин, 25 циклов с параметрами: денатурация при температуре 94 °С в течение 30 с, отжиг праймеров в течение 45 с (температура отжига подбирается в зависимости от праймера), элонгация при 72 °С в течение 40 с. Конечная элонгация при 72 °С 5 мин. Продукты амплификации разделяли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). Размер аллелей определяли при помощи программного обеспечения GeneMapper v4.1. (Applied Biosystem, США), используя стандарт S450 (GOrDIS, Россия).

Для генотипирования использовали надстройку для электронной таблицы MS Excel – GenAlEx 6.41 [11]. Информация об аллельном составе SSR-локусов у изученных образцов была занесена в электронную базу данных в формате Microsoft Excel-2003. Для оценки полиморфизма микросателлитных локусов использован индекс PIC (Polymorphic Index Content). $PIC = 1 - \sum(P_i^2)$, где P_i – частота i -ой аллели, выявленной в данной выборке [12].

Результаты и обсуждение

Анализ полиморфизма сортов льна проводили с использованием 18 пар SSR-праймеров, из которых 16 пар являются монолокусными. Праймеры Lu15 и Flu21 выявили по 2 локуса. Аллельный состав микросателлитных локусов для каждого сорта определяли по набору индивидуальных фрагментов ДНК, амплифицированных парой праймеров, специфичных

к уникальным последовательностям, фланкирующим определенный микросателлит. По результатам SSR-анализа была составлена бинарная база данных о наличии/отсутствии определенных аллелей изученных 20 SSR-локусов и выполнена оценка их полиморфизма; для этого рассчитывались значения PIC и число аллелей на локус.

Размер и количество аллелей, обнаруженные для каждого локуса, а также расчетные показатели, отражающие генетическое разнообразие сортов, рассчитывали отдельно для двух

выборок. В табл. 1 приведены показатели полиморфизма для 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси.

Таблица 1

Оценка полиморфизма SSR-локусов у 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр Беларуси

Локус	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер аллелей (п.н.)	*PIC	Число редких аллелей
Lu2	(TC) ₁₈	6	206–226	0,753	2
Lu4	(GA) ₉	9	156–180	0,786	4
Lu13	(AC) ₄ (AG) ₁₈	12	360–396	0,869	5
Lu15a	(CAT) ₈	8	100–127	0,690	5
Lu15b	(CAT) ₈	9	189–226	0,789	4
Lu3	(GT) ₁₁	7	156–172	0,807	2
Lu8	(AG) ₂₄	10	195–246	0,801	6
Lu21	(GA) ₁₅ A ₄	8	210–252	0,754	3
Lu17	(GA) ₂₆	9	273–291	0,777	5
Lu23	(CA) ₈ (GA) ₂₂	10	240–262	0,862	3
Lu28	(TCT) ₈	6	175–193	0,789	0
Flu8	(TTC) ₁₂ TTT(TTC) ₂₂ TTT(TTC) ₇	9	166–211	0,752	5
Flu7	(TTC) ₂₁	7	141–161	0,808	2
Flu9	(TTC) ₁₇	5	103–115	0,708	1
Flu11	(TTC) ₂₁	4	103–112	0,523	2
Flu24	(TTC) ₁₃	3	97–106	0,539	0
Flu25	(TTC) ₂₂ TTTTTT(TTC) ₇	11	179–229	0,832	5
Flu10	(TTC) ₁₀	9	141–164	0,711	4
Flu21a	(TTC) ₄ T(TTC) ₁₈	5	100–112	0,575	2
Flu21b	(TTC)4T(TTC) ₁₈	9	140–164	0,756	5
Итого		156	–	–	65
Среднее на локус		7,8 ± 0,531	–	0,744 ± 0,022	–

* – PIC – индекс полиморфизма; жирным шрифтом обозначены min и max значения показателей полиморфизма

В целом у 39 сортов льна выявлено 156 аллелей размером от 97 до 396 п.н. Средний показатель уровня полиморфизма локуса, рассчитанный для всей исследованной выборки, составил $0,744 \pm 0,022$ на один локус. Минимальным значением отличался локус Flu11, максимальным – локус Lu13. В зависимости от локуса, число аллелей варьировало от 3 (локус Flu24) до 12 (локус Lu13). Среднее значение количества аллелей в расчете на один локус у исследованных сортов составило 7,8.

Частота встречаемости различных аллелей 20 микросателлитных локусов варьировала от 1,3% до 61,5%. Оценивая полиморфизм SSR-локусов у изученных сортов, отдельно учитывали частоту встречаемости уникальных и редких

аллелей. Аллели относились к редким, если их частота в исследуемой выборке не превышала 5%. Уникальными аллелями считались аллели, которые встречались только у одного сорта выборки. Данная выборка из 39 сортов характеризовалась высокой частотой встречаемости редких аллелей – 41,7%, т.е. 65 аллелей из 156 были редкими и встречались с частотой менее 5% (табл. 1, рис. 1). Число редких аллелей выборки варьировало от 0 (локусы Lu28, Flu 24) до 6 (Lu8) на локус. Из 65 редких аллелей 30 аллелей (19,2%) были уникальными. В изученной выборке сортов льна обнаружен 31 сорт с редкими аллелями, в том числе 16 сортов с уникальными аллелями (табл. 2).

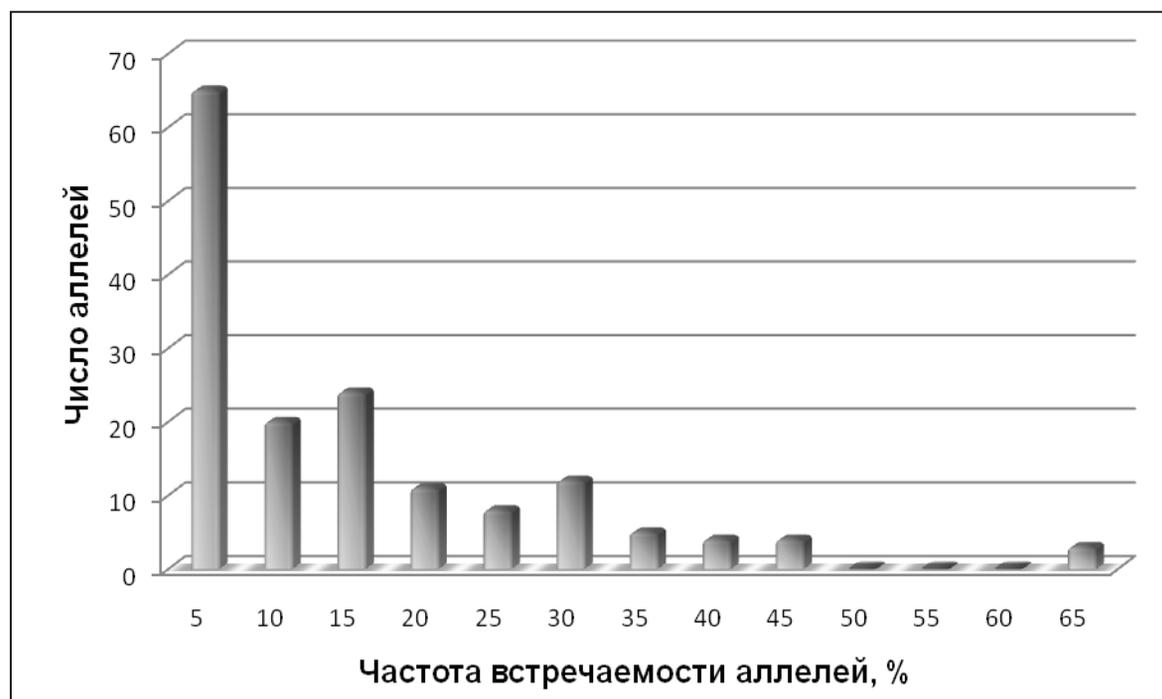


Рис. 1. Число и частота встречаемости аллелей 20 SSR-локусов в выборке из 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси

Максимальное число редких аллелей было зафиксировано у сортов Алей и Задор – по 13 аллелей. Восемь редких аллелей отмечено у сорта Сюрприз, по 6 редких аллелей имели сорта Вита, Лирина и Мерилин; 5 аллелей – сорт Старт;

по 4 – Табор, Форт, Нива, Ласка, Грот, Веста, Велич, Борец, Блакит; по 3 – Згода, Прамень, Ритм, Ярок, Белинка; по 2 – Ручеек, Йитка, Ива, Бренд, Дашковский; по 1 аллелю – Брестский, Весна, Е-68, Левит 1, Лето, Могилевский.

Таблица 2

Редкие аллели SSR-локусов 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси

Аллель		Сорт	Аллель		Сорт	
<i>Lu2</i>	206	Блакит, Ярок	<i>Lu15a</i>	127	Алей	
	216	Блакит, Форт, Ива, Могилевский		189	Борец, Ласка, Веста, Табор	
<i>Lu4</i>	156	Старт, Ритм	<i>Lu15b</i>	213	Задор	
	168	Згода, Йитка, Лирина		216	Сюрприз, Алей, Задор, Лирина	
	176	Мерилин, Грот, Табор		226	Сюрприз	
	180	Алей, Задор		160	Велич, Грот	
<i>Lu13</i>	366	Велич, Мерилин, Табор, Лирина	<i>Lu3</i>	172	Сюрприз, Задор	
	368	Бренд, Ручеек		195	Ярок	
	382	Брестский, Лирина, Ручеек	<i>Lu8</i>	203	Нива, Йитка	
	392	Задор		205	Нива, Ритм, Прамень	
	396	Алей		221	Мерилин	
100	Е-68	224		Сюрприз, Алей		
<i>Lu15a</i>	115	Сюрприз	<i>Lu21</i>	246	Старт	
	118	Борец, Алей, Прамень		212	Вита, Ярок, Табор	
	121	Задор		214	Блакит, Форт	

Продолжение табл. 2

Аллель		Сорт	Аллель		Сорт
Lu21	228	Сюрприз, Борец, Алей	Flu11	109	Алей, Блакит, Форт, Лирина
	252	Старт, Белинка		112	Борец, Задор
Lu17	279	Ласка, Веста	Flu25	179	Мерилин
	281	Дашковский		205	Лирина
	283	Бренд		208	Веста
	287	Мерилин, Весна		211	Старт, Левит 1, Нива, Белинка
	291	Алей, Задор, Вита		229	Алей, Вита
Lu23	244	Веста, Грот	Flu10	141	Старт, Нива, Ласка, Белинка
	254	Велич		144	Сюрприз
	262	Сюрприз		153	Вита
Flu8	166	Грот		Flu21a	159
	169	Велич	110		Алей
	172	Ива	112	Задор, Вита, Прамень	
	190	Ласка	Flu21b	140	Лето
	211	Алей		153	Згода, Дашковский
Flu7	150	Ритм, Вита, Згода		159	Форт, Мерилин
	161	Задор	164	Задор	
Flu9	115	Алей, Задор			

Примечание. Жирным шрифтом выделены сорта с уникальными аллелями

Следует отметить, что 14 сортов (Задор, Алей, Сюрприз, Ярок, Мерилин, Старт, Дашковский, Бренд, Велич, Грот, Ласка, Лирина, Веста и Вита) имели как редкие, так и уникальные аллели одновременно.

Аналогичный подход был использован для выборки из 15 стародавних белорусских сортов льна, полиморфизм которых был исследован теми же

методами с использованием тех же 18 пар SSR-праймеров. В этой выборке сортов в изученных локусах было выявлено от 2 (локус Flu24) до 16 (локус Flu25) аллелей, в среднем 7,15 аллелей на локус. Уровень полиморфизма изученных локусов был также высоким: значения индекса PIC варьировали от 0,480 до 0,918 в зависимости от локуса (в среднем $0,764 \pm 0,022$ на локус) (табл. 3).

Таблица 3

Оценка полиморфизма SSR-локусов у 15 стародавних белорусских сортов льна

Локус	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер аллелей (п.н.)	PIС*	Число редких аллелей
Lu2	(TC) ₁₈	8	198–218	0,751	5
Lu4	(GA) ₉	6	164–178	0,664	4
Lu13	(AC) ₄ (AG) ₁₈	10	362–392	0,756	7
Lu15a	(CAT) ₈	6	100–118	0,771	2
Lu15b	(CAT) ₈	6	189–216	0,809	1
Lu3	(GT) ₁₁	6	156–166	0,776	2
Lu8	(AG) ₂₄	8	189–215	0,813	4
Lu21	(GA) ₁₅ A ₄	6	210–220	0,796	1
Lu17	(GA) ₂₆	8	269–291	0,798	3
Lu23	(CA) ₈ (GA) ₂₂	8	238–258	0,820	3
Lu28	(TCT) ₈	5	175–190	0,744	1

Продолжение табл. 3

Локус	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер аллелей (п.н.)	PIC*	Число редких аллелей
Flu8	(TTC) ₁₂ TTT(TTC) ₂₂ TTT(TTC) ₇	15	142–205	0,916	11
Flu7	(TTC) ₂₁	7	139–156	0,831	2
Flu9	(TTC) ₁₇	5	103–115	0,720	2
Flu11	(TTC) ₂₁	5	100–112	0,682	1
Flu24	(TTC) ₁₃	2	97–100	0,480	0
Flu25	(TTC) ₂₂ TTTTTT(TTC) ₇	16	158–238	0,918	13
Flu10	(TTC) ₁₀	8	144–165	0,842	3
Flu21a	(TTC) ₄ T(TTC) ₁₈	3	100–106	0,624	0
Flu21b	(TTC)4T(TTC) ₁₈	5	144–156	0,776	1
Итого		143	–	–	66
Среднее на локус		7,15 ± 0,762	–	0,764 ± 0,022	–

* – PIC – индекс полиморфизма; жирным шрифтом обозначены min и max значения показателей полиморфизма

В этой выборке наименьшее значение индекса PIC выявлено для локуса Flu24, наибольшее – для локуса Flu25. Из 143 аллелей 20-ти SSR-локусов, обнаруженных у стародавних белорусских сортов, 66 (46,2%) относились к

редким (табл. 3, рис. 2), в том числе 40 аллелей (28%) были уникальными. В зависимости от локуса, число редких аллелей варьировало от 0 (локусы Flu21a, Flu24) до 13 (Flu25) (табл. 3).

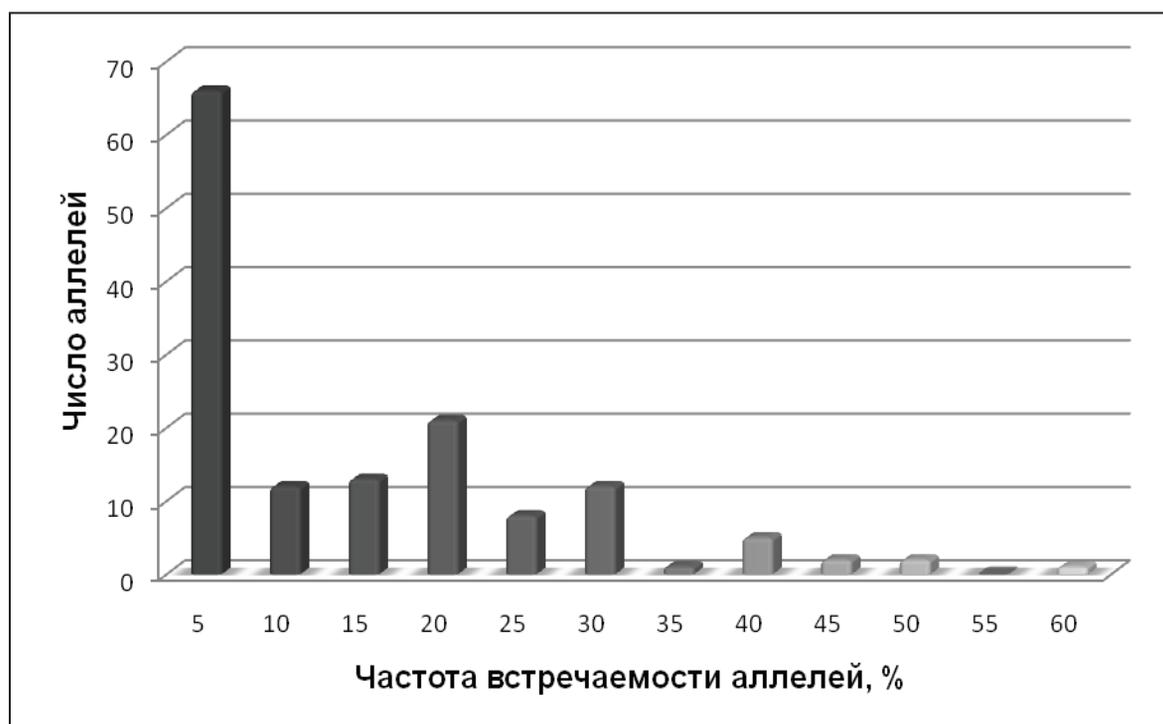


Рис. 2. Число и частота встречаемости аллелей 20 SSR-локусов в выборке 15 белорусских стародавних сортов льна

В изученной выборке из 15 сортов максимальное число редких аллелей зафиксировано у сорта К-5990 – 11 редких аллелей, 10 редких

аллелей имел сорт К-603, 8 – сорт К-790, по 7 – сорта К-6601, К-5455, К-5991, по 6 – К-5476, К-5460, К-5330, по 5 – К-37, К-5451, К-594, 4 ал-

леля – К-5992, 3 аллеля – К-6212, 2 аллеля – К-604 (табл. 4).

Показатели полиморфизма SSR-локусов у сортов двух изученных выборок оказались близки и достоверно не отличались ($P > 0,05$).

Для оценки уровня генетического разнообразия сортов в зависимости от периода их создания, были сформированы три группы, соответствующие различным периодам селекции льна:

№ 1 – стародавние белорусские сорта;
№ 2 – селекционные сорта льна, включенные в Госреестр РБ до 2000 года;

№ 3 – селекционные сорта льна, включенные в Госреестр РБ после 2000 года.

Группы сортов разных периодов селекции различались по объему. Так, группа № 1 насчитывала 15 сортов, группа № 2 – 11 сортов и группа № 3 – 28 сортов (табл. 5).

Таблица 4

Редкие аллели SSR-локусов 15 белорусских стародавних сортов льна

Аллель		Сорт	Аллель		Сорт	
Lu2	200	К-790	Flu8	142	К-5330, К-5451	
	208	К-5460, К-5991		145	К-5455	
	212	К-5330		151	К-5460, К-5476	
	214	К-5460		157	К-5451	
	216	К-5991		160	К-594, К-5455	
Lu4	164	К-5330, К-5990		163	К-37, К-594	
	170	К-37		175	К-790	
	176	К-5992		178	К-5990	
	178	К-790, К-5476		183	К-5990	
Lu13	362	К-5455		187	К-5991, К-603	
	372	К-604		190	К-5991	
	376	К-603	Flu7	139	К-790, К-5990	
	380	К-5460		156	К-5476, К-5991	
	382	К-5451	Flu9	103	К-5330	
	384	К-603		115	К-5455, К-5476	
392	К-6601	Flu11	112	К-6212, К-603		
Lu15a	100	К-37, К-603	Flu25	158	К-5451, К-5476	
	115	К-6601, К-5990		170	К-5460	
Lu15b	216	К-790, К-5990		173	К-5451	
Lu3	160	К-5990		176	К-5455, К-5476	
	166	К-37, К-594		179	К-594	
Lu8	189	К-5330		188	К-37	
	211	К-6601, К-5992		196	К-790, К-5990	
	213	К-6212		199	К-5990	
	215	К-603		202	К-5991, К-604	
Lu21	218	К-5460		214	К-594, К-5330	
Lu17	281	К-603		217	К-6601	
	283	К-6212		220	К-790, К-6601	
	291	К-603		238	К-603	
Lu23	244	К-5990		Flu10	159	К-790, К-5455
	246	К-5992, К-603			162	К-6601, К-5992
	252	К-6601	165		К-5991	
Lu28	190	К-5990	Flu21b	153	К-5455	

Таблица 5

Показатели полиморфизма 20 микросателлитных локусов у трех групп сортов, созданных в разные периоды, рассчитанные по данным SSR-анализа

№ группы	Группа/ количество сортов N	PIC (среднее)	Среднее значение, рассчитанное на сорт		
			Число аллелей	Число редких аллелей	Число уникальных аллелей
1	Стародавние сорта / N = 15	0,764	9,5	4,4	2,7
2	Селекционные сорта, включенные в Госреестр до 2000 года / N = 11	0,645	8,5	3,2	1,5
3	Селекционные сорта, включенные в Госреестр после 2000 года / N = 28	0,755	5,4	2,3	0,7

Для каждой группы сортов были рассчитаны показатели полиморфизма 20 микросателлитных локусов: индекс PIC, среднее число аллелей на сорт, среднее число редких аллелей на сорт, среднее число уникальных аллелей на сорт (табл. 5). Наиболее низкими значениями PIC характеризовались селекционные сорта группы № 2. Однако значения показателей числа аллелей, числа редких и уникальных аллелей (рассчитанные в среднем на сорт) оказались ниже у современных сортов группы № 3.

Одной из возможных причин выявленных различий между группами сортов по уровню генетического разнообразия может быть их разный объем по количеству генотипов. Для

нивелирования влияния различий по численности сортов в разных группах на величину показателей полиморфизма был использован метод бутстреп-размножения выборок [13]. Для этого в каждой из трех групп было создано по 10 подвыборок (каждая численностью в 11 сортов) методом случайного повторного отбора [14]. Для каждой группы № 1, № 2 и № 3, состоящей из 10 таких подвыборок, были рассчитаны показатели полиморфизма 20 микросателлитных локусов. Результаты приведены в табл. 6 и, для большей демонстративности, на рис. 3. Достоверность различий показателей полиморфизма у разных групп сортов рассчитывали с использованием *t* критерия Стьюдента.

Таблица 6

Показатели полиморфизма в трех группах сортов различных периодов селекции, вычисленные с использованием метода бутстреп-размножения выборок

№ подвыборки, (каждая включает по 11 сортов)	PIC	Число аллелей	Среднее число аллелей на сорт	Число редких аллелей	Среднее число редких аллелей на сорт	Число уникальных аллелей	Среднее число уникальных аллелей на сорт
Группа № 1, стародавние белорусские сорта и примитивные образцы							
1	0,716	102,0	9,3	28,0	2,5	19,0	1,7
2	0,724	117,0	10,6	56,0	5,1	26,0	2,4
3	0,733	123,0	11,2	62,0	5,6	33,0	3,0
4	0,756	122,0	11,1	52,0	4,7	29,0	2,6
5	0,749	129,0	11,7	65,0	5,9	40,0	3,6
6	0,703	108,0	9,8	50,0	4,5	21,0	1,9
7	0,735	121,0	11,0	55,0	5,0	28,0	2,5
8	0,723	120,0	10,9	57,0	5,2	40,0	3,6

Продолжение табл. 6

№ подвыборки, (каждая включает по 11 сортов)	РIS	Число аллелей	Среднее число аллелей на сорт	Число редких аллелей	Среднее число редких аллелей на сорт	Число уникальных аллелей	Среднее число уникальных аллелей на сорт
Группа № 1, стародавние белорусские сорта и примитивные образцы							
9	0,746	127,0	11,5	64,0	5,8	30,0	2,7
10	0,730	107,0	9,7	39,0	3,5	23,0	2,1
Среднее значение	0,732*	117,6	10,7*	52,8	4,8*	28,9	2,6*
Группа № 2, сорта льна, включенные в Госреестр Беларуси до 2000 г.							
1	0,629	88	8,0	27,0	2,5	17,0	1,5
2	0,662	89	8,1	34,0	3,1	4,0	0,4
3	0,632	89	8,1	35,0	3,2	15,0	1,4
4	0,620	89	8,1	40,0	3,6	15,0	1,4
5	0,661	90	8,2	33,0	3,0	7,0	0,6
6	0,640	87	7,9	26,0	2,4	14,0	1,3
7	0,597	85	7,7	32,0	2,9	17,0	1,5
8	0,653	88	8,0	29,0	2,6	6,0	0,5
9	0,583	77	7,0	23,0	2,1	6,0	0,5
10	0,640	91	8,3	32,0	2,9	16,0	1,5
Среднее значение	0,632	87,3	7,9	31,1	2,8	11,7	1,1
Группа № 3, сорта льна, включенные в Госреестр Беларуси после 2000 г.							
1	0,691	11	1,0	54,0	4,9	26,0	2,4
2	0,688	104	9,5	55,0	5,0	26,0	2,4
3	0,741	121	11,0	56,0	5,1	30,0	2,7
4	0,707	113	10,3	54,0	4,9	28,0	2,5
5	0,700	109	9,9	45,0	4,1	22,0	2,0
6	0,724	123	11,2	67,0	6,1	34,0	3,1
7	0,734	120	10,9	59,0	5,4	28,0	2,5
8	0,744	122	11,1	59,0	5,4	32,0	2,9
9	0,744	120	10,9	56,0	5,1	28,0	2,5
10	0,750	124	11,3	27,0	2,5	23,0	2,1
Среднее значение	0,722*	106,7	9,7*	53,2	4,8*	27,7	2,5*

* – значения данных показателей полиморфизма достоверно выше в группах № 1 и № 3 по сравнению с группой № 2 при $P > 0,05$.

При использовании метода бутстреп-размножения выборок для подсчета показателей полиморфизма у разных групп сортов сорта группы № 2 имели достоверно более низкие значения показателя РIS, числа аллелей, числа редких и уникальных аллелей (рассчитанные в среднем на сорт) по сравнению

как со стародавними сортами (группа № 1), так и с современными сортами (группа № 3). Современные сорта (группа № 3) и стародавние сорта (группа № 1) по показателям РIS, числу аллелей, числу редких и уникальных аллелей на сорт достоверно не различались. Более низкие значения показателей уровня

полиморфизма у селекционных сортов льна, включенных в Госреестр до 2000 года, могут объясняться как методами селекции, так и использованием в этот период селекции ограни-

ченного числа сортов-доноров, используемых для гибридизации и создания исходного материала для селекционного процесса при выведении новых сортов.

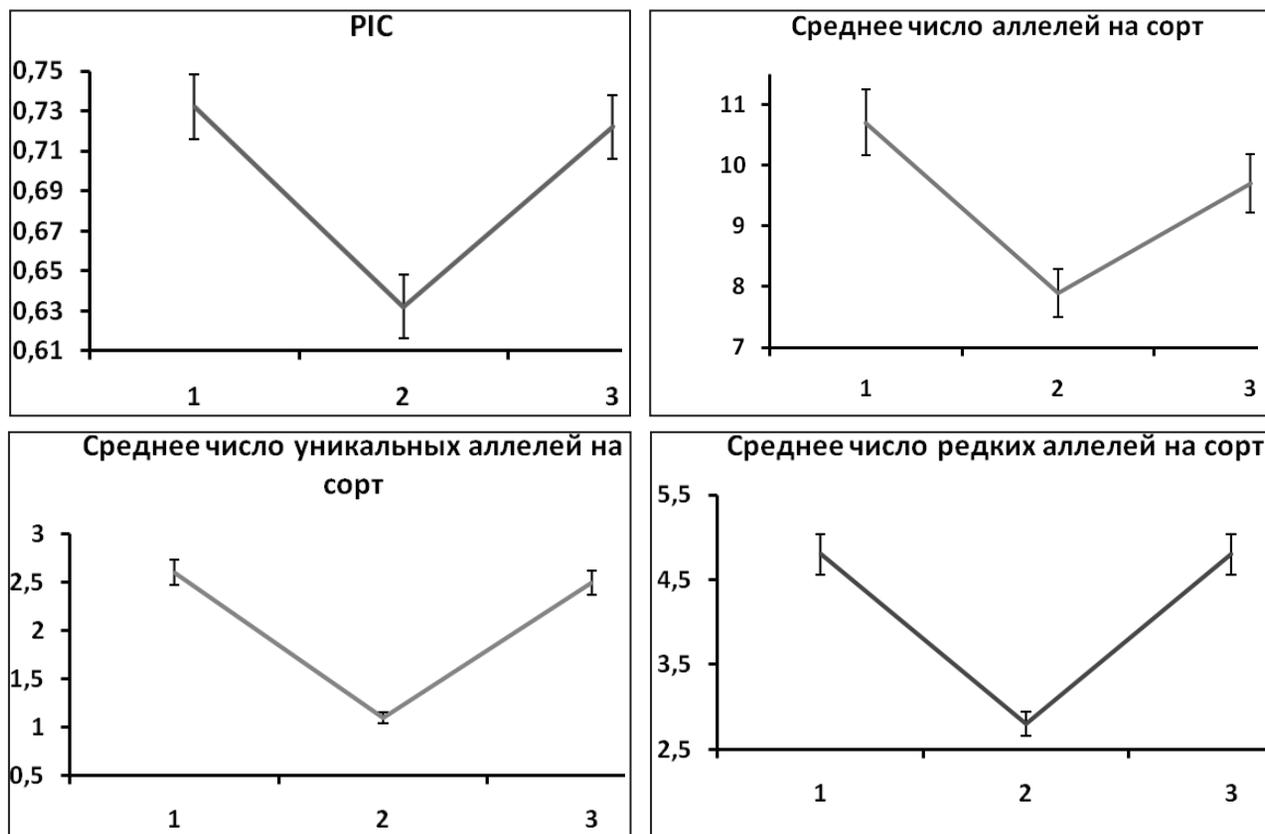


Рис. 3. Значения показателей полиморфизма у сортов различных периодов селекции (№ 1, № 2, № 3), рассчитанные по результатам анализа полиморфизма 20 микросателлитных локусов

В первой половине XX века наиболее распространенным методом селекции был аналитический, так называемый массовый отбор, при котором семена лучших растений объединяли и высевали вместе [15], что объясняет большое генетическое разнообразие стародавних сортов (группа № 1). В послевоенный период льноводство в Беларуси возрождалось в основном за счет районирования российских сортов льна, которые впоследствии включались в селекцию. Так, в 1956 году в Беларуси был районирован высокопродуктивный сорт Смоленской ГОСХОС Л-1120 [15], который использовался в дальнейшем при создании многих сортов в качестве донора генов устойчивости к фузариозному увяданию и ржавчине [16], что привело к генетической однородности возделываемых сортов льна-долгунца (группа №2). Это подтверждается и данными

RAPD-анализа стародавних и современных сортов льна [17].

В последние годы в республике проводится интенсивная селекционная работа по созданию большого количества новых высокопродуктивных сортов льна (группа № 3) с привлечением современных методов селекции и включением в селекционный процесс зарубежных сортов. Вследствие этого происходит восстановление и расширение генетического разнообразия современных сортов. Однако привлекая в селекционный процесс зарубежные сорта, не стоит забывать о стародавних местных белорусских сортах, которые хорошо приспособлены к условиям среды своего региона, обладают большим количеством уникальных аллелей, и генетический потенциал которых должен быть всесторонне изучен и использован в полной мере.

Заключение

Таким образом, выявлено 156 аллелей 20-ти SSR-локусов у 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси. Максимальное число аллелей (12) определено для локуса Lu13, минимальное (3 аллеля) выявлено для локуса Flu24. Уровень полиморфизма для данной выборки достаточно высок: значения PIC варьировали от 0,526 до 0,869 со средним значением 0,744. Выявлено 65 редких аллелей у 31 сорта, из них 16 сортов (41% выборки) имели уникальные аллели.

Для выборки из 15 стародавних белорусских сортов и примитивных образцов (ландрасы) по тем же 20-ти SSR-локусам выявлено 143 аллеля. Максимальное число аллелей (16) определено для локуса Flu25, минимальное (2 аллеля) – для локуса Flu24. Уровень полиморфизма для данной выборки был также достаточно высоким: значения PIC варьировали от 0,480 до 0,918 со средним значением 0,764. Выявле-

но 66 редких аллелей, причем редкие аллели имели все сорта выборки, а уникальные аллели обнаружены у 14 сортов (93% выборки).

Изученные выборки характеризовались высокой частотой встречаемости редких аллелей – больше 40%. Однако частота встречаемости уникальных аллелей в выборке из 15 белорусских стародавних сортов льна (28%) была достоверно выше, чем в выборке 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси (19,2%).

Селекционные сорта льна, включенные в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси до 2000 года, имели достоверно ($P < 0,05$) более низкие значения показателей генетического полиморфизма по сравнению с белорусскими стародавними сортами и современными селекционными сортами, включенными в реестр после 2000 года.

Список использованных источников

1. Vromans, J. Molecular genetic studies in flax (*Linum usitatissimum* L.). / J. Vromans // Wageningen University, The Netherlands [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: <http://edepot.wur.nl/22222>. – Date of access: 18.01.2013.
2. Сергеев, Д.А. Сравнительное изучение полиморфизма ДНК различных сортов пшеницы с использованием молекулярных маркеров: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12; 03.00.15 / Д.А. Сергеев; Ин-т физиологии растений и генетики Акад. наук Респ. Таджикистан. – Душанбе, 2009. – 26 с.
3. Fu, Y.B. Geographic patterns of RAPD variation in cultivated flax / Y.B. Fu // Crop Science. – 2005. – V. 45. – P. 1084–1089.
4. Fu, Y.B. RAPD Analysis of 54 North American Flax Cultivars / Y.B. Fu [et al.] // Crop Science. – 2003. – V. 43. – P. 1510–1515.
5. Oh, T.J. RFLP and RAPD mapping in flax (*Linum usitatissimum*) / T.J. Oh, M. Gorman, C.A. Cullis // Theor. Appl. Genet. – 2000. – V. 101. – P. 590–593.
6. Adugna, W. The use of morphological and AFLP markers in diversity analysis of linseed / W. Adugna, M.T. Labuschagne, C.D. Viljoen // Biodivers Conserv. – 2006. – V. 15. – P. 3193–3205.
7. Roose Amsaleg, C. Polymorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum* / C. Roose Amsaleg [et al.] // Mol. Ecol. Notes. – 2006. – V. 6 – P. 796–799.
8. Deng, X. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from flax (*Linum usitatissimum* L.) / X. Deng. [et al.] // African Journal of Biotechnology. – 2011. – V. 10, N 5. – P. 734–739.
9. Bickel, C.L. SSR markers developed for genetic mapping in flax (*Linum usitatissimum* L.) / C.L. Bickel [et al.] // Res. Rep. Biol. – 2011. – V. 2011, N. 2. – P. 23–29.
10. Сулимова, Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г.Е. Сулимова // Успехи соврем. биологии. – 2004. – Т. 124, № 3. – С. 260–271.
11. Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – V. 6. – P. 288–295.
12. Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations / M. Nei // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. – 1973. – V. 70. – P. 3321–3323.

13. Швачко, Н.А. Генетическое разнообразие селекционных сортов картофеля коллекции ВИР, выявленное SSR анализом: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07 / Н.А. Швачко; Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова. – Санкт-Петербург, 2012. – 22 с.
14. Дубров, А.М. Многомерные статистические методы / А.М. Дубров, В.С. Мхитарян, Л.И. Трошин. – М: Финансы и статистика, 2003. – 352 с.
15. Лен Беларуси / И.А. Голуб [и др.]; НАН Беларуси, РУП «Белорусский научно-исследовательский институт льна»; под ред. И.А. Голуба. – Минск: ЧУП «Орех», 2003. – 245 с.
16. Рожмина, Т.А. Генетическое разнообразие льна (*Linum usitatissimum* L.) и его комплексное использование в селекции: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 06.01.05, 03.00.15 / Т.А. Рожмина; Санкт-Петербург, 2004. – 42 с.
17. Лемеш, В.А. Молекулярный анализ гетерогенности белорусских сортов и ландрас льна / В.А. Лемеш // Доклады НАН Беларуси. – 2007. – Т. 51, № 6. – С. 78–81.

Дата поступления статьи 1 июля 2013 г.

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РАЗВИТИИ ИНФАРКТА МИОКАРДА (ГЕНДЕРНЫЕ И ВОЗРАСТНЫЕ АСПЕКТЫ)

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

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей причиной смертности в мире. Большую роль в патогенезе ССЗ играет тромбозирование артериальных сосудов. Частота тромбозов артерий сердца при инфаркте миокарда составляет 85–90%. Частота инфаркта миокарда в Беларуси составляет примерно 15 000 случаев в год.

Известны факторы внешней среды, predisposing к возникновению сердечно-сосудистых заболеваний – провоцирующие, или средовые факторы риска. Среди них выделяют такие, как курение, ожирение, диабет, малоподвижный образ жизни, гипертензия, гормонотерапия и др.

Однако большой вклад в риск артериальных тромбозов вносят и наследственные факторы, что подтверждается развитием болезней сердца, в частности, инфаркта миокарда в молодом возрасте (в 20–40 лет), а также при наличии аналогичного анамнеза у близких родственников больного [1]. В исследовании на близнецах было показано, что у монозиготных близнецов конкордантность по развитию инсульта на 65% выше по сравнению с дизиготными близнецами, что позволило установить, что вклад наследственных факторов в смертность от ИБС составляет приблизительно 50% [2].

В ряде работ [3, 4] были оценены риски ССЗ на основе когортных исследований, а также исследований «случай-контроль». Были сделаны выводы, что наличие у членов семьи инсульта или инфаркта миокарда свидетельствует о высокой (до 76%) степени риска данного заболевания у остальных близких родственников.

Одним из наиболее плодотворных подходов к изучению генетических механизмов развития ССЗ является выявление генетических маркеров, ассоциированных с развитием заболева-

ния, с помощью молекулярно-генетических методов. Данного рода исследования дают возможность установить вовлеченность в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний конкретных генов-кандидатов и на этой основе выявить группы лиц с более высоким генетическим риском развития заболевания.

К настоящему времени выявлено несколько десятков генетических вариантов, носительство которых ассоциировано с развитием протромботических сдвигов в системе гемостаза. Большинство из них кодирует компоненты плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. Однако факторы, определяющие генетическую предрасположенность к артериальным тромбозам, в мире изучены недостаточно, и полученные результаты порой противоречивы. В связи с этим исследования генов, изменения которых могут являться факторами риска возникновения артериальных тромбозов, являются необходимыми и актуальными.

Исходя из современных представлений о физиологических механизмах патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний, можно выделить группы генов, нарушение структуры и функционирования которых могут вносить наибольший вклад в развитие атерогенных заболеваний. Это полиморфизмы Thr312Ala α -цепи фибриногена, Val34Leu XIII фактора свертываемости крови и 4G/5G гена *PAI-1* (ген ингибитора активатора плазминогена), а также мутация Factor V Leiden.

Исследование этих вариантов генов как возможных факторов риска развития ССЗ обусловлено тем, что альтернативные аллели данных полиморфизмов меняют структуру белков, участвующих в процессе тромбообразования.

Поскольку определенные условия среды могут как способствовать, так и препятствовать проявлению неблагоприятной наследствен-

ности, выявление групп повышенного риска среди населения позволит снизить вероятность развития ССЗ. Зная о своей предрасположенности к атеротромбозам, человек может скорректировать свой образ жизни и устранить провоцирующие факторы, такие, как курение, лишний вес, гиподинамия и т.д.

Информация о генетической предрасположенности к ССЗ позволяет также разработать рекомендации по ранней диагностике и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, корректно определять прогноз развития опасных осложнений, правильно выбирать методы лечения, избежать повторных случаев инфаркта миокарда (ИМ).

Материалы и методы

Группа пациентов, перенесших инфаркт миокарда, состояла из 180 человек. Образцы крови больных были предоставлены Республиканским научно-практическим центром «Кардиология» МЗ Беларуси. Контрольная группа лиц, не имеющих в анамнезе тромботических эпизодов, составила 278 человек.

В качестве биологического материала была использована ДНК, экстрагированная из пятен крови, высушенных на специальных бланках.

Для определения аллелей полиморфизма альфа-цепи фибриногена Thr312Ala использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Профилактика инфаркта миокарда имеет большое социальное значение, т.к. позволяет снизить инвалидизацию и смертность населения и повысить качество жизни.

Для корректной оценки риска ИМ важно учитывать гендерные и возрастные аспекты генетической предрасположенности к развитию этого заболевания. Известно, что инфаркт миокарда бывает гораздо чаще у мужчин, чем у женщин, и чаще проявляется в пожилом возрасте, хотя в последнее время появились данные о том, что заболевание «молодеет». Поэтому целью данной работы явилось определение зависимости генетической предрасположенности к ИМ от пола пациента и его возраста.

с последующим рестрикционным анализом описанный Carter et al. [5] Электрофоретическое разделение полученных фрагментов ДНК проводили в 8%-ном полиакриламидном геле при напряжении 15В/см в течение часа с последующей окраской бромистым этидием (рис. 1).

Из-за наличия двух постоянных сайтов рестрикции в случае аллеля Ala312 выявляются три фрагмента ДНК с длиной 25, 48 и 117 пар оснований (п.о.). В случае аллеля Thr312 формируется дополнительный сайт рестрикции, в результате чего вместо фрагмента в 117 п.о., образуются фрагменты длиной 78 и 39 п.о.

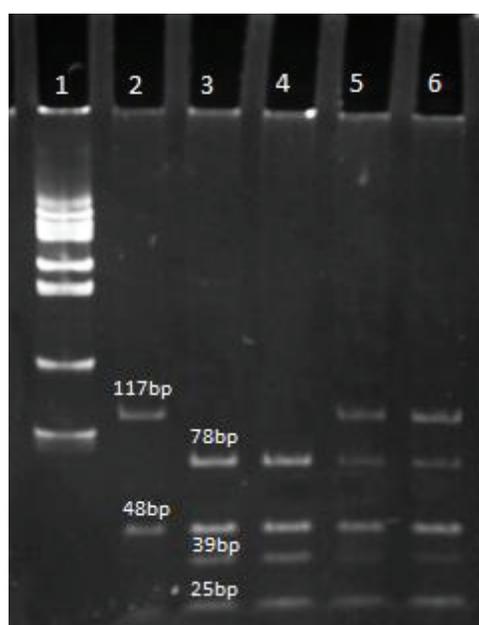


Рис. 1. Схема рестрикции 190 bp продукта амплификации рестриктазой Rsa I. Лунка 1 – Fermentas 100bp ladder, образец 2 – гомозигота по аллелю 312Ala, образцы 3,4 – гомозиготы по аллелю Thr312, образцы 5,6 – гетерозиготы

Для определения аллелей полиморфизма Val34Leu XIII фактора свертываемости крови была разработана собственная методика на основе принципа Tetra-primer ARMS [6]. Состав реакционной смеси конечным объемом 20 мкл и условия амплификации были следующими: 1хПЦР буфер, 2 мМ MgCl₂, 200 мкМ dNTP, по 5 пМ внешних праймеров и по 10 пМ внутренних, 1 ЕД Taq полимеразы.

Последовательности нуклеотидов для праймеров были следующими:

Val34Leu-FI: 5`-GACCTGCCACAGTGGAGCTTCAGGACT-3`;

Val34Leu-RI: 5`-GGTTGACGCCCCGGGCACTAC-3`;

Val34Leu-FO: 5`-GTCAAAAATGTCAGAACTTCCAGGACCGCCTTT-3`;

Val34Leu-RO: 5`-TGGACCCAGAGTGGTGGGAAGGG-3`.

После денатурации образцов при 95 °С в течение 5 минут проводили 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 45 с денатурации при 95 °С, 30 с отжига при 65 °С и 25 с синтеза при 72 °С. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживали в течение 2 мин при 72 °С.

Разделение продуктов ПЦР проводили с помощью вертикального электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле при напряжении 15 В/см в течение часа с последующим окрашиванием бромистым этидием (рис. 2).



Рис. 2. Результат электрофореза при детекции мутации Val34Leu. Лунка 1 – Fermentas 20bp ladder, образцы 3,4 – гомозиготы по аллелю Val34, образцы 2,7 – гетерозиготы, образцы 5,6 – гомозиготы по аллелю 34Leu

В результате амплификации образуются фрагменты ДНК различной длины: а) фрагмент длиной 170 п.о. – образуется всегда при прохождении амплификации, является продуктом внешних праймеров; б) фрагмент длиной 130 п.о. – образуется в случае наличия аллеля Val34, является продуктом праймеров Val34Leu-RI и Val34Leu-FO; в) фрагмент длиной 92 п.о. образуется в случае наличия аллеля 34Leu, является продуктом праймеров Val34Leu-FI и Val34Leu-RO.

Определение аллельных вариантов полиморфизма 4G/5G гена *PAI-1* выполняли с использованием автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 после амплификации специфиче-

ских ДНК последовательностей гена методом ПЦР (рис. 3).

Амплификацию проводили с использованием праймеров, фланкирующих участок ДНК, содержащий данный полиморфизм. Для анализа образцов ДНК в автоматическом анализаторе в ПЦР-продукт необходимо было ввести флуоресцентную метку в процессе амплификации. Для этой цели синтезирован меченый вариант прямого праймера PAI-1F, имевшего молекулу «репортера» 6-FAM на 3` конце:

PAI-1F – CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-FAM;

PAI-1R – CCAACAGAGGACTCTTGGTCT.

Реакционная смесь с конечным объемом 20 мкл содержала 1хПЦР буфер, 2,5мМ MgCl₂, 200 мкМ dNTP, по 5 пМ праймеров и 0,75 ЕД

Тақ полимеразы. После денатурации образцов при 95 °С в течение 5 минут следовали 35 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 с денатурации при 95 °С; 30 с отжига при 54 °С и 40 с синтеза при 72 °С. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживали в течение 5 мин при 72 °С.

Из каждой реакции 1,5 мкл амплификата сме-

шивали с 0,5 мкл маркера молекулярного веса ROX 350 (Applied Biosystems) и 8,5 мкл деионизированного формамида. Смесь денатурировали 2 мин при 95 °С. Электрофорез проводили при следующих параметрах: время инъекции образца в капилляр 7 с, время разделения 24 мин, напряжение 7,5 кВ, длина детектора 36 см. Для разделения использовали 4%-ный раствор полимера POP-4™ (Applied Biosystems).

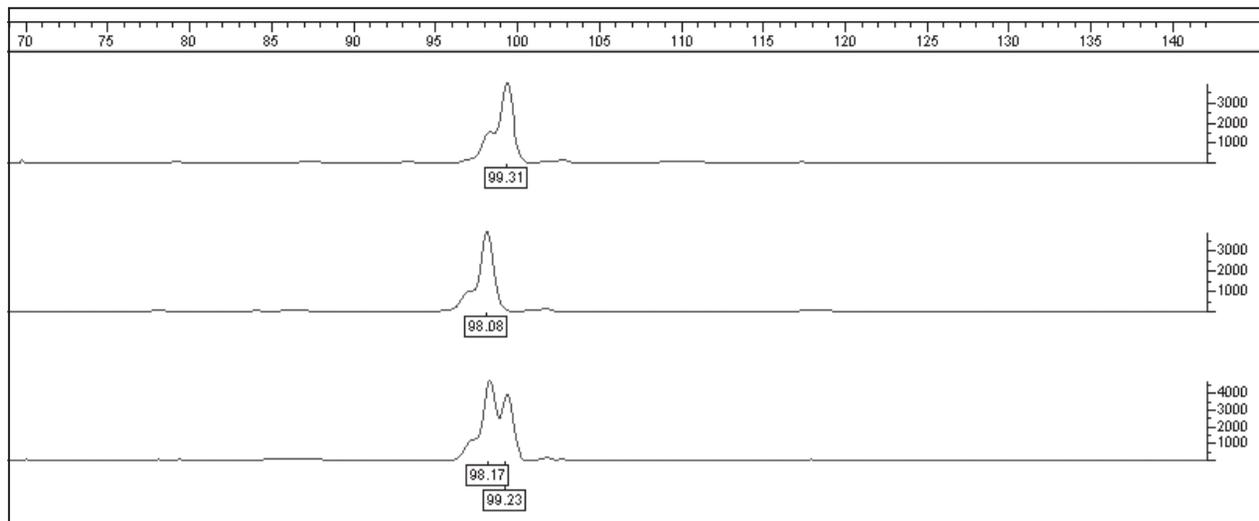


Рис. 3. Варианты генотипа по полиморфизму 4G/5G гена *PAI-1*, идентифицированные в ходе проведения исследования: 1 – аллели 5/5; 2 – 4/4; 3 – 4/5

Результаты и обсуждение

Сравнение генетических факторов риска ИМ у мужчин и женщин

При исследовании пациентов, перенесших инфаркт миокарда, нами ранее выявлены генотипы, повышающие риск ИМ в 1,5–2 раза [7–9]. Это генотипы Leu\Leu гена XIII фактора свертываемости крови, Thr\Ala гена I фактора свертываемости крови, 4G\4G гена *PAI-1* и

Лейденская мутация (мутация V фактора свертываемости крови).

Показано, что большее значение имеют не единичные факторы риска, а их сочетания. Так, наибольшим вкладом в предрасположенность к ИМ обладают аллельные варианты Thr\Ala_Leu\Leu_5G\5G, Ala\Ala_Val\Leu_4G\4G и Thr\Ala_Leu\Leu_4G\4G (табл. 1).

Таблица 1

Отношение частот сочетаний генотипов риска ИМ в исследованных группах

Комбинация генотипов	Отношение частоты встречаемости сочетаний генотипов в группе с ИМ к частоте встречаемости в контрольной группе
Thr\Ala_Val\Leu_4G\5G	1,2
Thr\Ala_Val\Leu_4G\4G	1,2
Thr\Ala_Val\Val_5G\5G	1,4
Thr\Ala_Val\Val_4G\5G	1,6
Thr\Ala_Val\Val_4G\4G	1,8
Thr\Thr_Leu\Leu_4G\4G	1,8

Продолжение табл. 1

Комбинация генотипов	Отношение частоты встречаемости сочетаний генотипов в группе с ИМ к частоте встречаемости в контрольной группе
Thr\Ala_Leu\Leu_5G\5G	2,7
Ala\Ala_Val\Leu_4G\4G	2,9
Thr\Ala_Leu\Leu_4G\4G	4,0

Из табл. 1 явно прослеживается тенденция, что с увеличением в комбинации количества аллельных вариантов риска ИМ возрастает частота встречаемости данной комбинации в группе пациентов с ИМ по сравнению с контролем.

При наличии в комбинации одновременно вариантов Thr\Ala и Leu\Leu частота ее встречаемости у пациентов в 2,7 раза выше, чем в контроле, т.е. даже чаще, чем лейденской мутации в гетерозиготном состоянии.

Частоты сочетаний Thr\Ala_Leu\Leu_4G\4G и Ala\Ala_Val\Leu_4G\4G в контрольной группе и в группе пациентов, перенесших ИМ, различаются в 3–4 раза. Очевидно, эти комбинации аллельных вариантов вносят наибольший вклад в предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям.

По нашим данным, в группе пациентов, перенесших инфаркт миокарда, женщины составляют 15,5% от выборки, а мужчины, соответственно, 84,5%. Такое распределение пациентов по полу в случайной выборке пациентов, перенесших ИМ, подтверждает тезис о том, что ИМ гораздо чаще бывает у мужчин.

На рис. 4 представлены частоты наиболее часто встречаемых комбинаций генотипов в выборке пациентов мужского пола, перенесших инфаркт миокарда. Из 9 наиболее частых комбинаций генотипов, представленных на этом рисунке, 4 оказывают существенное влияние на предрасположенность к инфаркту миокарда.

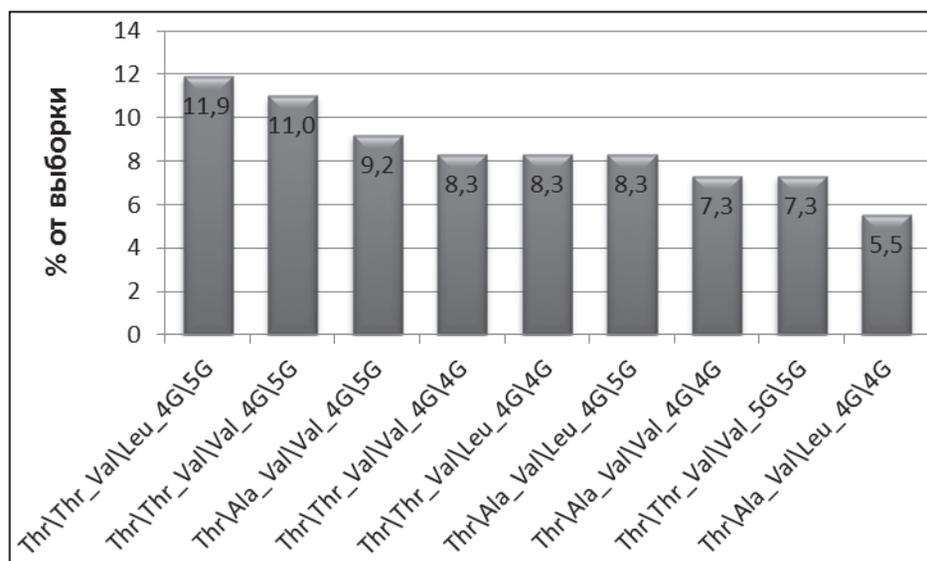


Рис. 4. Частоты комбинаций генотипов в группе пациентов мужского пола, перенесших инфаркт миокарда (отображены комбинации генотипов, встречаемость которых превышает 5%)

На рис. 5 представлены частоты наиболее часто встречаемых комбинаций генотипов в выборке пациентов женского пола, перенесших инфаркт миокарда. Комбинаций генотипов здесь намного меньше, чем у мужчин, что видимо

связано с небольшой выборкой женщин с ИМ.

Следует отметить, что частоты комбинаций генотипов, предрасполагающих к развитию инфаркта миокарда у женщин, достаточно велики – 30%.

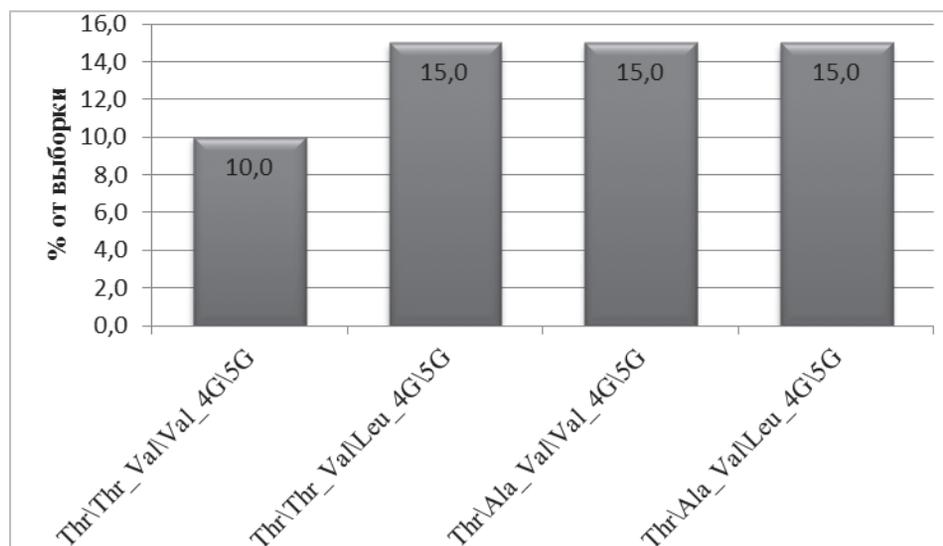


Рис. 5. Частоты комбинаций генотипов в группе пациентов женского пола, перенесших инфаркт миокарда (отображены комбинации генотипов, встречаемость которых превышает 5%)

В целом, по большинству частот комбинаций генотипов группы мужчин и женщин отличаются незначительно, однако для ряда комбинаций были получены заметные различия. Так, например, для комбинаций генотипов Thr\Ala_Leu\Leu_4G\4G, Thr\Thr_Leu\Leu_4G\4G и Ala\Ala_Val\Leu_4G\4G частоты в женской группе составили 5% для каждой комбинации, в то время как в мужской группе частоты для них составили 0,9%, 0,9% и 1,8% соответственно. А поскольку эти комбинации являются одними из наиболее сильно влияющих на развитие ИМ (табл. 1), то это может свидетельствовать в пользу гипотезы о том, что женщины являются

более подверженными риску развития ИМ в связи с проявлением именно наследственных факторов, в то время как у мужчин больший вклад вносят средовые факторы.

Возможно, еще одним свидетельством в пользу этого может являться различие в частотах комбинации Thr\Thr_Val\Val_5G\5G, нейтральной по своему влиянию на предрасположенность к ИМ, – в мужской группе частота этой комбинации составляет 7,3%, а в женской группе ее наличие не зарегистрировано вовсе.

В табл. 2 представлены сведения о доле пациентов (мужчин и женщин) с различным количеством факторов риска в генотипе.

Таблица 2

Сравнение долей мужчин и женщин, перенесших ИМ, с различным количеством генетических факторов риска тромбозов

	1 Фактор риска, %	2 фактора риска, %	3 Фактора риска, %	Всего с факторами риска, %
Мужчины (n = 152)	45,0	17,4	0,9	63,3
Женщины (n = 28)	45,0	20,0	5,0	70,0

Вклад комбинаций генотипов, повышающих предрасположенность к данному заболеванию, у мужчин составляет 63,3%. В то же время доля предрасполагающих комбинаций генотипов у женщин составила 70%, т.е. оказалась несколько выше, чем у противоположного пола. Особого внимания заслуживает факт, что у женщин ча-

стога случаев ИМ, обусловленных 3-мя факторами риска, в 5 раз выше, чем у мужчин. Этот факт подтверждает сделанный выше вывод о том, что у женщин риск развития ИМ в большей степени обусловлен проявлением именно наследственных факторов, в то время как у мужчин существенный вклад вносят средовые факторы.

Анализ генетических составляющих ИМ в зависимости от возраста пациентов

Для анализа возрастных особенностей группа пациентов с ИМ была разделена на подгруппы:

- пациенты, перенесшие ИМ до 39 лет включительно;
- пациенты, перенесшие инфаркт в возрасте от 40 до 49 лет включительно;
- пациенты, перенесшие инфаркт в возрасте от 50 до 59 лет включительно;

- пациенты, перенесшие инфаркт в возрасте от 60 до 69 лет включительно;
- пациенты, перенесшие ИМ после 70 лет.

Результаты, полученные при разделении выборки на подгруппы по возрасту, представлены на рис. 6 и в табл. 3.

В подгруппе с возрастом до 39 лет оказалось 2 человека, один из которых имел в генотипе один фактор риска – аллельный вариант Leu\Leu, а второй – два фактора риска – аллельные варианты Thr\Ala_ и _4G\4G.

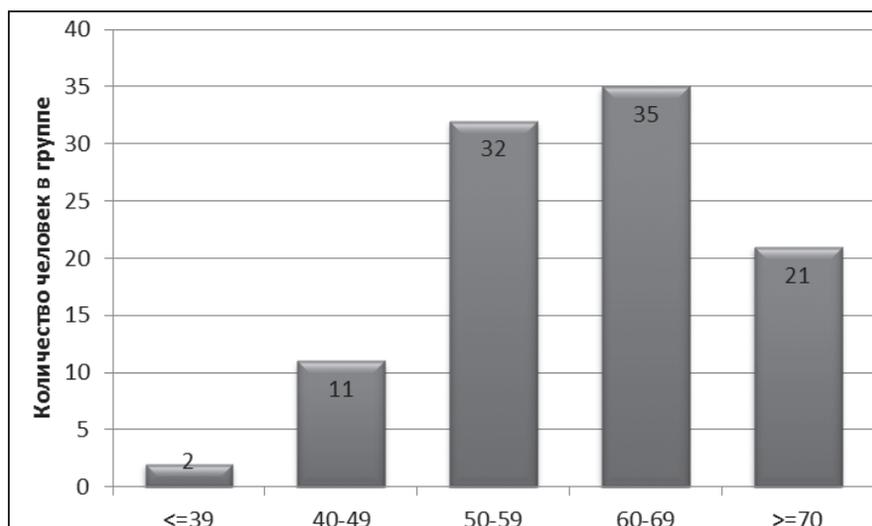


Рис. 6. Возрастной состав пациентов, перенесших ИМ

Таблица 3

Доли пациентов с ИМ разных возрастных групп с различным количеством факторов риска, %

	1 Фактор риска	2 фактора риска	3 Фактора риска	Всего с факторами риска
<=39	50	50	0	100
40-49	45,5	36,4	0	81,9
50-59	62,5	9,4	0	71,9
60-69	42,9	8,6	5,7	57,2
>70	42,9	14,3	0	57,2

Из табл. 3 можно увидеть, что чем больше у человека генетических факторов риска, тем раньше реализуется наследственная предрасположенность к ИМ – процент людей в подгруппах с генетическими факторами риска уменьшается с увеличением возраста: до 39 лет – 100%, 40–49 лет – 81,9%, 50–59 лет – 71,9%, 60–69 лет – 57,1% и старше 70 лет – 57,1%.

Определение коэффициента корреляции между возрастом и количеством факторов рис-

ка ИМ представлено на рис. 7.

Коэффициент корреляции, равный -0,965, свидетельствует об очень высокой обратной корреляции между анализируемыми параметрами, на основании чего можно сделать вывод, что наследственные факторы риска ИМ вносят большой вклад в заболеваемость более молодых лиц и с увеличением возраста растет эффект средовых факторов, для проявления которых требуется более длительный срок.

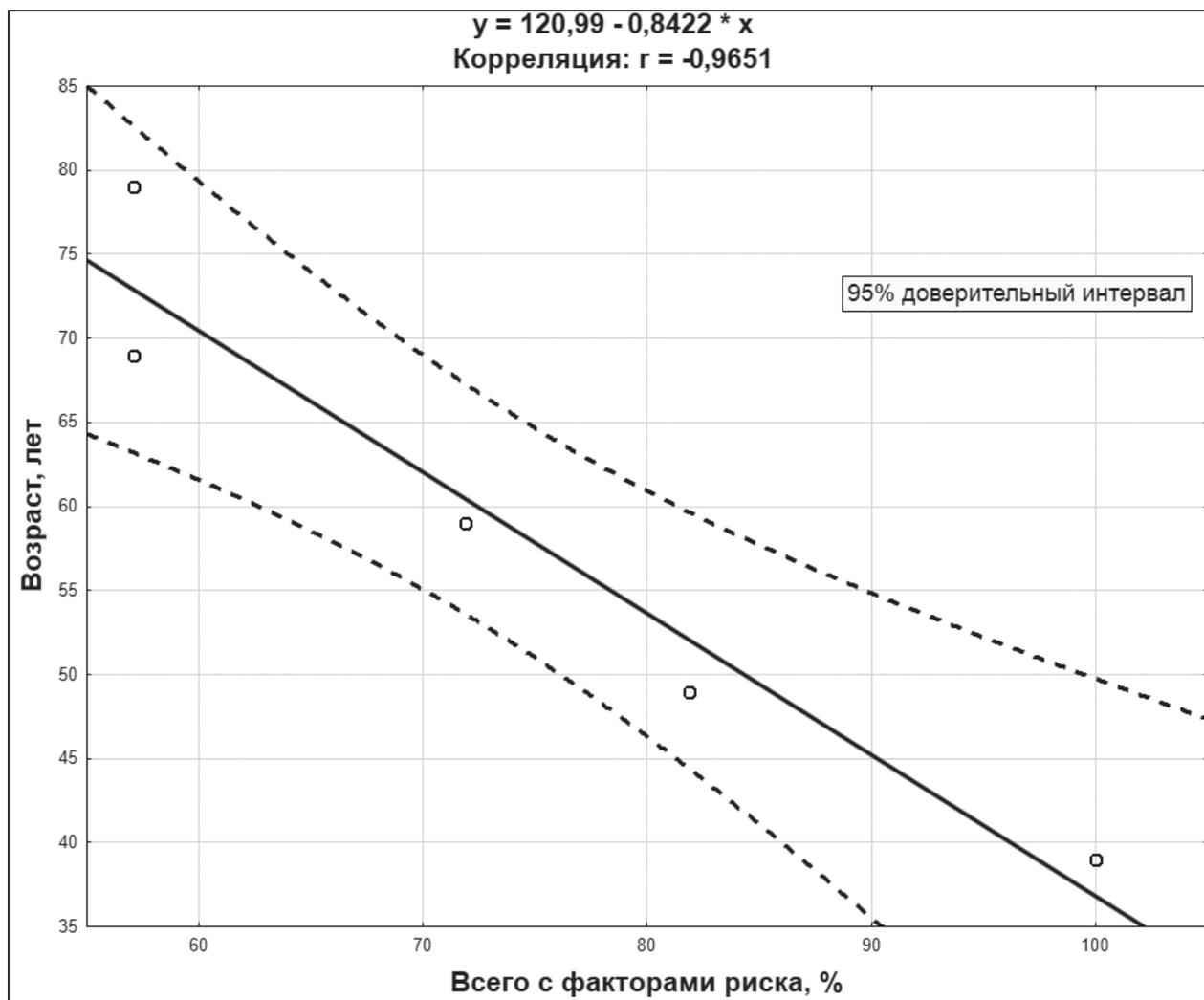


Рис. 7. Расчет коэффициента корреляции между возрастом пациентов и количеством факторов риска ИМ в их генотипах

Заключение

Проведено сравнение частот наиболее часто встречаемых комбинаций генотипов риска у пациентов мужского пола по сравнению с пациентами-женщинами, перенесшими инфаркт миокарда. Выявлены аллельные сочетания с наибольшим вкладом в предрасположенность к ИМ (Thr\Ala_Leu\Leu_5G\5G, Ala\Ala_Val\Leu_4G\4G, Thr\Ala_Leu\Leu_4G\4G). Проанализированы гендерные особенности распределения комбинаций генотипов риска ИМ –

у женщин риск развития ИМ в большей степени обусловлен проявлением именно наследственных факторов, в то время как у мужчин существенный вклад вносят средовые факторы.

Показано, что наследственная предрасположенность к ИМ чаще реализуется в более раннем возрасте, причем, чем больше у человека факторов риска ИМ, тем раньше реализуется эта предрасположенность, а с увеличением возраста увеличивается вклад средовых факторов.

Список использованных источников

1. Rosenberg, R.D. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states / R.D. Rosenberg, W.C. Aird // N. Engl. J. Med. – 1999. – Vol. 340. – P. 1555–1564.
2. The heritability of CHD mortality in Da-

nish twins after controlling for smoking and BMI / A. Wienke [et al.] // Twin Res. Human Genet. – 2005. – Vol. 8. – P. 53–59.

3. Flossmann, E. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epi-

demiology of ischemic stroke / E. Flossmann, U.G. Schulz, P.M. Rothwell // *Stroke*. – 2004. – Vol. 35. – P. 212–227.

4. The effect of age on the genetic susceptibility to mortality from stroke in men and women: 35 years of follow-up in the Swedish Twin Registry / M.E. Marenberg [et al.] // 29th International Stroke Conference, San Diego, Calif. – 2004.

5. Association of the α -fibrinogen Thr312Ala polymorphism with poststroke mortality in subjects with atrial fibrillation / A.M. Carter [et al.] // *Circulation*. – 1999. – Vol. 99. – P. 2423–2426.

6. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms / Shu Ye [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2001. – Vol. 29, No. 17: e88.

7. Molecular-genetic analysis of genetic predisposition to myocardial infarction and comparison of risk factor population rates in different countries / A. Gonchar [et al.] // *Radiobiology and Environmental Security*. – Springer. – 2011. – P. 111–126.

8. Комплекс генов коагуляционного каскада, ответственных за предрасположенность к инфаркту миокарда / И.Б. Моссэ [и др.] // *Кардиология в Беларуси*. – 2011. – № 5 (18). – С. 259.

9. Вклад генов *PAI-1* (ингибитора активатора плазминогена) и *LDLR* (гена рецептора липопротеина низкой плотности) в комплекс экологических и генетических факторов, приводящих к инфаркту миокарда / И.Б. Моссэ [и др.] // *Науковi працi*. – 2011. – Выпуск 157. – С. 49–54.

Дата поступления статьи 16 августа 2013 г.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

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

²РУП «Институт защиты растений»
Республика Беларусь, 223011, Минская обл., д. Прилуки, ул. Мира, 2

Введение

Препараты на основе энтомопатогенных бактерий являются наиболее эффективным и широко используемым средством борьбы с вредными насекомыми и занимают около 90–95% мирового рынка биоинсектицидов [1]. Применяемые для производства биоинсектицидов энтомопатогенные бактерии обычно принадлежат к виду *Bacillus thuringiensis*, который родственен генетически близким видам *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis* [2]. Точная идентификация этих видов чрезвычайно важна, поскольку штаммы *B. thuringiensis* используются в качестве продуцентов биоинсектицидов, *B. anthracis* является возбудителем сибирской язвы, а многие штаммы *B. cereus* – причиной пищевых отравлений. Основным методом идентификации и внутривидовой классификации изолятов *B. thuringiensis* является Н-серотипирование, основанное на определении иммунологической реакции к флагеллину – белку бактериальных жгутиков. По данным [3], насчитывается более 69 Н-серотипов штаммов вида *B. thuringiensis*, в 10 из которых обнаружена внутривидовая вариабельность антигена [4]. Причиной такого разнообразия является вариабельность кодирующего флагеллин гена *hag*. В геномах бактерий *B. thuringiensis* этот ген фланкирован консервативными участками прилегающих генов, что позволяет проводить амплификацию его последовательностей с помощью универ-

сальных праймеров. С помощью типирования на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена *hag* возможно определение принадлежности новых изолятов к известным сероварам при отсутствии антисывороток.

Коллекция Института защиты растений НАН Беларуси насчитывает 28 штаммов энтомопатогенных бактерий, идентифицированных как *B. thuringiensis*. Они были изолированы на территории различных районов Минской и Брестской областей Республики Беларусь из взрослых особей и личинок различных видов насекомых, принадлежащих к отрядам жесткокрылых и чешуекрылых, что позволяет предположить их принадлежность к различным подвидам и сероварам. Коллекция включает в себя как бактерии являющиеся продуцентами инсектицидных препаратов, так и штаммы, перспективные в качестве основы для разработки новых биоинсектицидов. Таксономическая идентификация этих штаммов при помощи молекулярно-генетических методов не проводилась. Лишь у некоторых из них с помощью традиционных методов была определена принадлежность к серотипам.

Цель настоящей работы – проведение молекулярно-генетического типирования перспективных для использования в качестве основы биоинсектицидов энтомопатогенных бактерий из коллекции РУП «Институт защиты растений».

Материалы и методы

В работе использовали двадцать один штамм энтомопатогенных бактерий из коллекции РУП «Институт защиты растений» и типовой штамм *Bacillus cereus* ВІМ В-169^Г из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (БИМ). Сведения об источниках и времени выделения

энтомопатогенных бактерий приведены в табл. 1.

Выделение общей ДНК для использования в ПЦР проводили методом лизиса в присутствии Chelex 100 [5].

Использованные в работе праймеры приведены в табл. 2.

Таблица 1

Характеристика кристаллоносных бацилл, выделенных из погибших насекомых в Республике Беларусь

Вид	Штамм	Год выделения	Насекомое-хозяин, место сбора, биоценоз
<i>Bacillus thuringiensis</i>	LP1	1985	Гусеница пяденицы, черная смородина, сад, д. Лошица-1, Минский р-н
	LP2	1984	Гусеница зимней пяденицы, сад, д. Корзюки, Минский р-н
	LP3	1986	Гусеница медведицы кайя, частный сад, г. Несвиж, Минская обл.
	LP4	1979	Гусеница яблонной плодовой гусеницы, сад, д. Лошица-2, Минский р-н
	LP5		Гусеница яблонной плодовой гусеницы, сад, д. Лошица-1, Минский р-н
	LP6		Гусеница яблонной плодовой гусеницы, частный сад, Минский р-н
	LP7	1990	Куколка капустной совки, совхоз «Рассвет», Минский р-н
	LP8	1991	Гусеница листовертки под корой, Беловежская пуца, кв. № 458, Хвойническое лесничество, сосна, ель
	LP9		Куколка жука-рогача, Беловежская пуца, кв. № 457, Хвойническое лесничество, сосна, ель
	LP10		Куколка жука-рогача, Беловежская пуца, кв. № 323, дубрава
	LP11		Личинка жука-рогача, Беловежская пуца, кв. № 295, сосна, ель
	LP12		Куколка жука-рогача, Беловежская пуца, кв. № 713, смешанный лес
	LP13		Имаго, жук-рогач, Беловежская пуца, кв. № 713, смешанный лес
	LP14		Имаго, жук-щелкун, Беловежская пуца, кв. №506, березовая роща
	LP15		Имаго жужелицы, Беловежская пуца, кв. № 713, смешанный лес
	LP16		Куколка жужелицы, Беловежская пуца, кв. № 773, смешанный лес
	LP17		Имаго жужелицы, Беловежская пуца, кв. № 264, смешанный лес
	LP18		Имаго долгоносика, Беловежская пуца, кв. № 264, ель, сосна
	LP19		Личинка шелкоуна, Беловежская пуца, кв. № 264, ель, сосна
	LP20		Имаго жука-рогача, Беловежская пуца, кв. № 264, ель, сосна
	LP21		Личинка жука-короеда, Беловежская пуца, кв. № 264, ель, сосна

Таблица 2

Характеристика праймеров

Праймер	Последовательность	Ссылка
27f	5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	[6]
960r	5' GCTTGTGCGGGTCCCCG 3'	[7]
519r	5' GWATTACCGCGGCKGCTG 3'	
ERIC IR1	5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3'	[8]
ERIC2	5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'	
BOXA1R	5' CTACGGCAAGGCGACCTGACG 3'	[9]
Bc-REP-1	5' ATAAAGTTTCACTTTAT 3'	[10]
Bc-REP-2	5' TTTAATCAGTGGGG 3'	
Bt hag F1	5-AGTACATGCGCCAAAACCAAG-3'	[11]
Bt hag R1	5'-GTTTGCTTGAGAAAGCATGCT-3'	

Генетическое типирование. Для Рер-ПЦР при 30 мкл реакционной смеси использовали 10X буфер (Диалат Ltd., Россия), 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 1 единицу BioTaq-полимеразы (Диалат Ltd., Россия), праймеры (табл. 2) ERIC IR1, ERIC2 (по 60 пмолей каждого индивидуально), VOXA1R (60 пмолей), Vc-REP-1 и Vc-REP-2 (по 60 пмолей) и 0,5 мкл геномной ДНК в качестве матрицы. В случае ERIC-ПЦР реакцию начинали инкубированием реакционной смеси при 95 °С в течение 5 минут, затем следовало 4 цикла состоящих из инкубаций: 94 °С – 5 мин, 40 °С – 5 мин, 72 °С – 5 мин, которые сменялись 35 циклами, состоящими из 94 °С – 1 мин, 55 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин. Реакцию завершали инкубированием смеси при 72 °С в течение 10 минут. В случае VOX-ПЦР каждый из 35 циклов состоял из инкубаций: 94 °С – 1 мин, 45 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин. Завершающую элонгацию проводили при 72 °С в течение 10 мин. В случае РЕР-ПЦР каждый из 30 циклов состоял 94 °С – 1 мин, 42 °С – 1 мин, 72 °С – 1,5 мин. Завершающую элонгацию проводили при 72 °С в течение 7 мин.

Электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле в стандартном трис-боратном буфере половинной концентрации [12]. Гели окрашивали этидиум бромидом и фотографировали при просвечивании ультрафиолетовыми лучами с помощью системы GelDoc 2000 (Bio-Rad).

Матрицы для секвенирования генов 16S рРНК исследуемых штаммов синтезировали методом ПЦР с использованием универсальных праймеров 27f и 960g, для секвенирования генов *hag* – с помощью праймеров Bt *hag* F1 и Bt *hag* R1 (табл. 2). Реакционная смесь (30 мкл) содержала 3 мкл 10X буфера (Диалат Ltd., Россия), 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, по 60 пмолей каждого

из праймеров, 1 единицу BioTaq-полимеразы (Диалат Ltd., Россия) и 0,5 мкл общей ДНК в качестве матрицы. Амплификацию генов 16S рРНК проводили в градиентном термоциклере MJ Mini™ (Bio-Rad). ПЦР начинали инкубированием реакционной смеси при 95 °С в течение 4 минут, затем следовало 30 циклов, состоящих из инкубаций: 94 °С – 30 секунд, 55 °С – 30 секунд, 72 °С – 2 минуты. Реакцию завершали инкубированием смеси при 72 °С в течение 10 минут. При амплификации генов *hag* температуру отжига праймеров понижали до 45 °С, а время элонгации уменьшали до 1 минуты. Очистку продуктов амплификации проводили путем вырезания единичных фрагментов ДНК с последующей их экстракцией из 1,5% геля, используя набор реагентов DNA Extraction Kit (Fermentas). При необходимости ПЦР фрагменты генов *hag* у части исследуемых штаммов перед секвенированием клонировали в плазмиду pBluescript II KS (+) согласно [13].

Секвенирование фрагментов генов 16S рРНК и *hag* идентифицируемых бактерий проводили на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) с использованием набора для секвенирования BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Компьютерную обработку данных, полученных в результате секвенирования, проводили в программе Sequencing Analysis Software v5.2 (Applied Biosystems). Анализ сходства нуклеотидных последовательностей проводили с использованием базы данных GenBank при помощи анализатора BLAST Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Филогенетический анализ и построение дендограмм осуществляли по алгоритму Neighbor Joining [14] с помощью пакета программ Mega 4 [15].

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы осуществили типирование энтомопатогенных бактерий с помощью Рер-ПЦР при использовании индивидуальных праймеров ERIC IR1, ERIC2, VOXA1R, и пары праймеров Vc-REP-1/Vc-REP-2. (рис. 1).

Наибольшей дифференцирующей способностью обладал праймер ERIC IR1, позволивший разделить исследуемые бактерии на

три неравнозначных по численности группы (рис. 1А). Большинство штаммов, 18 из 21, вошли в группу I, внутри которой отсутствовали различия по составу продуктов амплификации (штаммы LP1–LP3, LP5, LP6, LP8–LP13, LP15–LP21). Паттерны штаммов группы I состояли из 14 основных фрагментов размером от 220 до 2000 пар нуклеотидов (п.н.). Паттерны бактерий группы II (LP4 и LP7) существенно

отличались от штаммов группы I по количеству и размеру амплифицируемых фрагментов. Паттерны штаммов LP4 и LP7 включали в свой состав 10 фрагментов размером от 150 до 2000 п.н., из которых только 2 соответствовали по размеру фрагментам паттерна группы I (600 и 2000 п.н.). В группу III был выделен единственный штамм LP14, паттерн которого был близок штаммам группы I и не содержал фрагментов в диапазоне 700–2000 п.н., но имел 2 до-

полнительных фрагмента размером около 580 и 620 п.н. при отсутствии фрагмента размером 600 п.н. (рис. 1А). При использовании праймера ERIC2 (рис. 1Б) и пары Bc-REP-1/Bc-REP-2 (рис. 1Г) разделение штаммов на группы было сходным, за исключением того, что паттерны штамма LP14 были идентичны паттернам бактерий группы I. При анализе с помощью ВОХ-ПЦР различий между исследуемыми штаммами не было выявлено (рис. 1В).

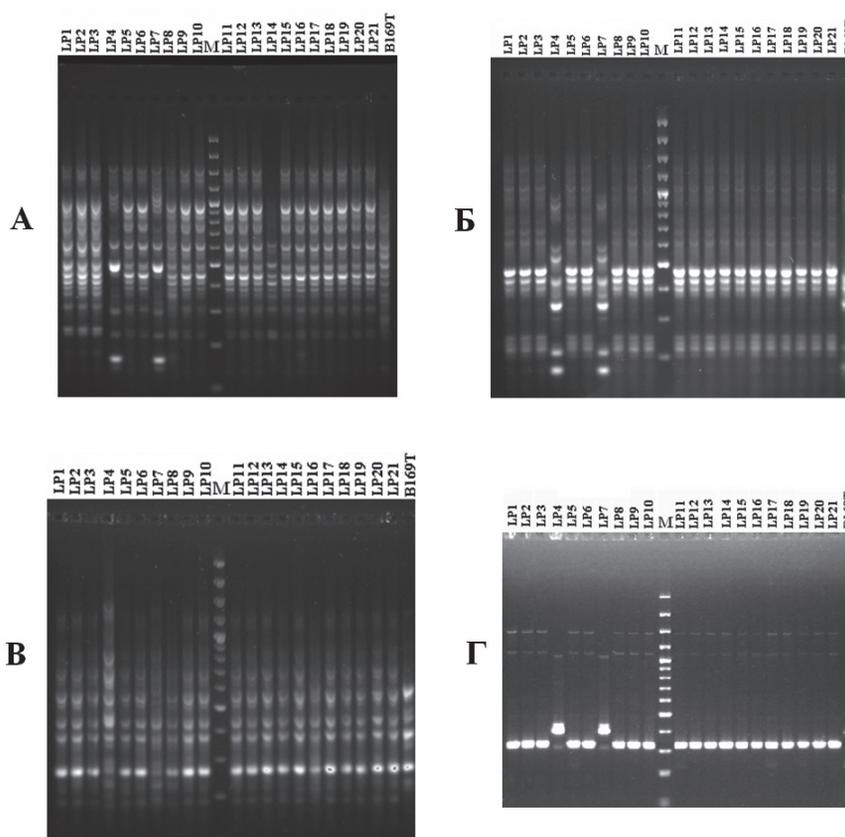


Рис. 1. Rep-ПЦР типирование штаммов энтомопатогенных бактерий с помощью праймеров: А – ERIC IR1, Б – ERIC2, В – BOXA1R, Г – Bc-REP-1/Bc-REP-2. Дорожки обозначены номерами исследуемых штаммов. М – маркер молекулярной массы – Gene Ruler™ 100 bp (Fermentas)

На втором этапе работы нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК шести представителей из всех трех генотипических групп (LP2, LP4, LP7, LP8, LP11 и LP14) были определены на протяженности более 350 п.о. и депонированы в GenBank (номера доступа KF258818–KF258823 соответственно). В результате поиска наиболее сходных последовательностей в базе данных GenBank была установлена принадлежность исследуемых бактерий к группе близкородственных видов *B. cereus* – *B. thuringiensis* – *B. anthra-*

cis. При проведении филогенетического анализа бактерии генотипических групп I и III и типовой штамм *B. thuringiensis* образовывали обособленную ветвь в кластере близкородственных видов группы *B. cereus*, в то время как положение в нем штаммов группы II было неустойчивым (рис. 2).

Результаты филогенетического анализа коррелировали с результатами Rep-генотипирования и позволили отнести энтомопатогенные бактерии генотипических групп I и III к генотипу *Bacillus thuringiensis*, в то время как

таксономическое положение бактерий LP4 и LP7 могло быть определено лишь до уровня группы видов *B. Thuringiensis* – *B. Cereus* – *B. anthracis*.

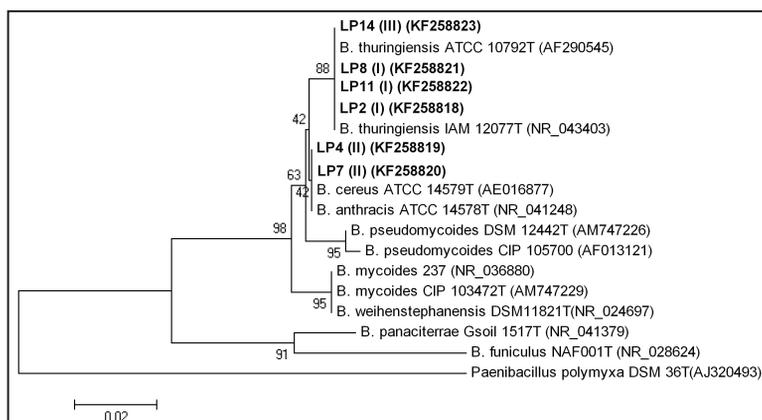


Рис. 2. Филогенетическое дерево, показывающее родство исследуемых энтомопатогенных штаммов и бактерий рода *Bacillus*.

В скобках приведены номера доступа последовательностей в GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Блок сравнения включает 294 нуклеотида. Значения бутстрапа вычислены на основании анализа 1000 деревьев. Линейка соответствует 0,02 замене на нуклеотидную позицию

На третьем этапе работы проводили типирование исследуемых изолятов на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *hag* с целью определения принадлежности данных штаммов к известным сероварам. При амплификации гена флагелли-

на *hag* всех бактерий генотипических групп I и III с помощью пары консервативных праймеров Bt *hag* F1 и Bt *hag* R1 происходило образование продукта размером около 1000 п.о., в то время как для штаммов группы II было характерно образование ампликона длиной около 750 п.о. (рис. 3).

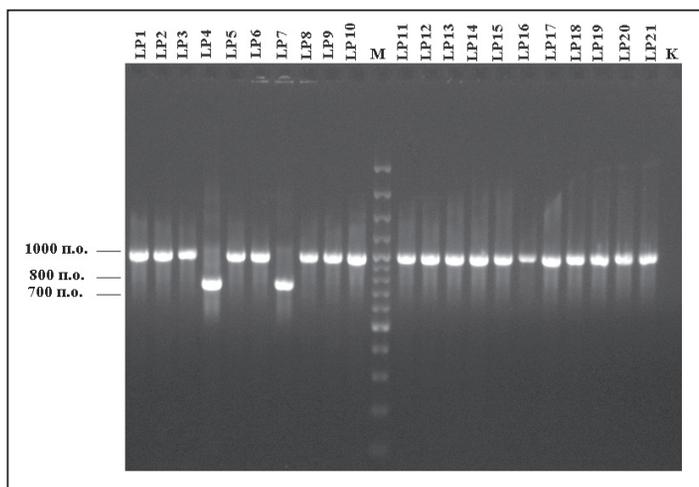


Рис. 3. Обнаружение генов *hag* с помощью геноспецифичной ПЦР.

Дорожки обозначены номерами исследуемых штаммов, М – маркер молекулярной массы Gene Ruler™ 100bp (Fermentas), К – контроль без матрицы

У представителей всех генотипических групп (LP2, LP4, LP7, LP8, LP11 и LP14) были определены нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов гена *hag* и депонированы в GenBank (номера до-

ступа KF258824–KF258830). При этом в геноме штаммов генотипической группы II были выявлены несколько копий генов *hag*, имеющих различия в нуклеотидных последовательностях. Такая внутриклональная варибель-

ность гена флагеллина характерна для части представителей *B. thuringiensis* и уже описана в литературе [4]. Поиск наиболее сходных нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank (табл. 3) и последующий филогенетический анализ (рис. 4) позволили определить принадлежность бактерий из генотипических групп I и III к *B. thuringiensis*

serovar darmstadiensis. Штаммы группы II были наиболее близки бактериям *B. thuringiensis* serovar alesti и *B. thuringiensis* serovar kurstaki. Дифференциация этих сероваров на основании имеющихся данных оказалась невозможной. Штаммы LP4 и LP7 могут принадлежать к любому из этих сероваров либо иметь собственный, ранее неизвестный серотип.

Таблица 3

Сходство нуклеотидных последовательностей *hag* генов энтомопатогенных бактерий из коллекции лаборатории биологического метода защиты растений РУП «Институт защиты растений» и наиболее сходных штаммов из базы данных GenBank, %

Бактерии (Номера доступа нуклеотидных последовательностей в GenBank)	LP2	LP4 locus A	LP4 locus C	LP7 locus B	LP8	LP11	LP14
<i>B. thuringiensis</i> serovar darmstadiensis (DQ377242)	99,3				100	99,5	99,9
<i>B. thuringiensis</i> serovar andalouisiensis (DQ377236)	94,7				95,4	94,7	95,6
<i>B. thuringiensis</i> serovar londrina (DQ377230)	92,8				93,5	93	93,7
<i>B. thuringiensis</i> serovar jegathesan (DQ377234)	83,9				84,7	84,1	84,6
<i>B. thuringiensis</i> serovar alesti (locus A)(X67138)		99,9	93,6	93,2			
<i>B. thuringiensis</i> serovar alesti (locus B)(X67138)		93,2	88,9	99,9			
<i>B. thuringiensis</i> serovar alesti (locus C)(X67138)		93,1	98,5	89,2			
<i>B. thuringiensis</i> serovar kurstaki (DQ377225)		99,9	93,4	93			
<i>B. thuringiensis</i> serovar kurstaki (locus A) (EF595775)		99,7	93,4	93			
<i>B. thuringiensis</i> serovar kurstaki (locus B) (EF595775)		93,2	88,9	99,9			
<i>B. thuringiensis</i> serovar kurstaki (locus C) (EF595775)		93,1	98,5	89,2			
<i>B. thuringiensis</i> serovar fukuokaensis (DQ377247)		90,5	95,2	90,7			
<i>B. thuringiensis</i> serovar fukuokaensis (locus C) (EF595778)		90,8	95,3	90,9			
<i>B. thuringiensis</i> serovar fukuokaensis (locus B1) (EF595778)		93,2	90,7	94,2			
<i>B. thuringiensis</i> serovar fukuokaensis (locus B2) (EF595778)		90,1	88,7	94,4			

Примечание. Полужирным выделены наиболее высокие значения сходства.

Заключение

В результате молекулярно-генетического типирования получены новые знания о клональной структуре циркулирующих на территории Беларуси энтомопатогенных бактерий, определено их таксономическое положение и принадлежность к антигенным группам в соответствии с современной серотипической классификацией.

Результаты типирования указывают на низкое генетическое разнообразие исследован-

ных бактерий. Учитывая разнообразие источников изолирования, их пространственную и временную изоляцию, можно предположить, что на территории Беларуси циркулирует незначительное число штаммов *B. thuringiensis*, являющихся хозяевами плазмид, несущих различные детерминанты патогенности для насекомых.

Исследование выполнено при поддержке гранта БРФФИ Б11-111.

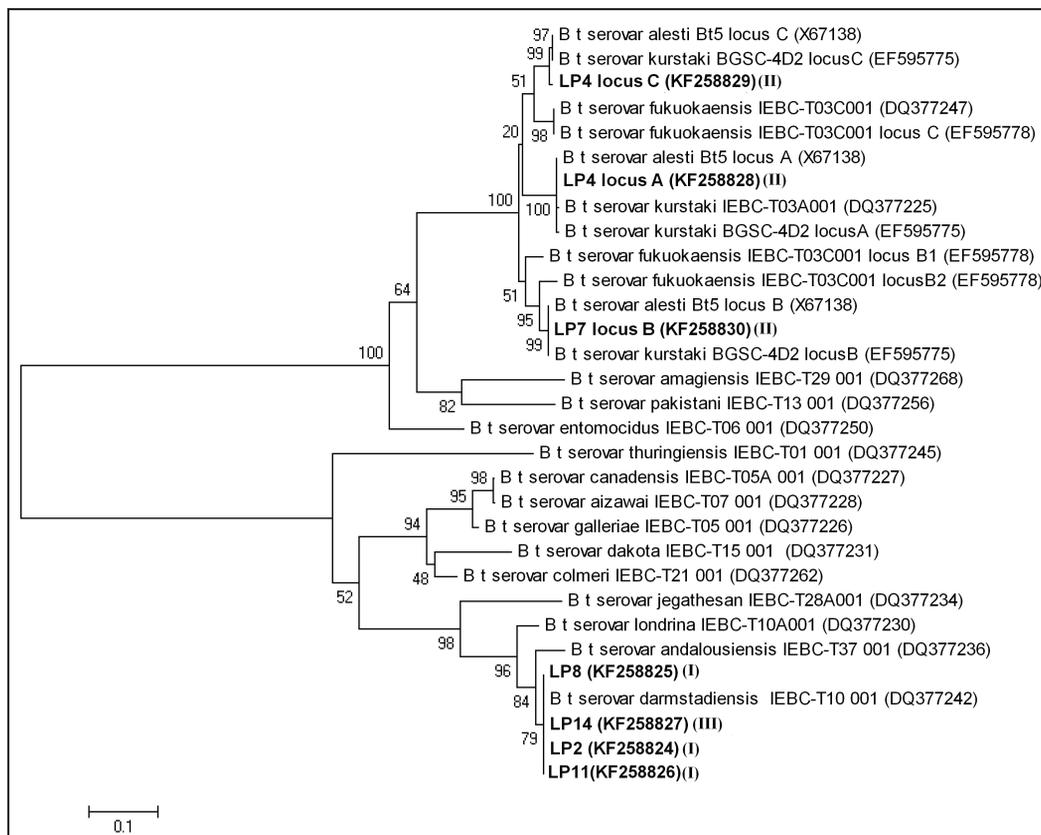


Рис. 4. Филогенетическое дерево, показывающее родство исследуемых энтомопатогенных штаммов и представителей известных сероваров бактерий *Bacillus thuringiensis*.

В скобках приведены номера доступа последовательностей в GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Блок сравнения включает 503 нуклеотида. Значения бутстрапа вычислены на основании анализа 1000 деревьев. Линейка соответствует 0,02 замене на нуклеотидную позицию

Список использованных источников

- Feitelson, J.S. *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond / J.S. Feitelson, J. Payne, L. Kim // *BioTechnology*. – 1992. – V. 10. – P. 271–275.
- Vilas-Bôas, G.T. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis* / G.T. Vilas-Bôas, A.P.S. Peruca, O.M.N. Arantes // *Can. J. Microbiol.* – 2007. – V. 53. – P. 673–687.
- Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis* / M.-M. Lecadet [et al.] // *J. Appl. Microbiol.* – 1999. – V. 86. – P. 660–672.
- Xu, D. Sequence diversity of *Bacillus thuringiensis* flagellin (H antigen) protein at the intra-H serotype level / D. Xu, J.-C. Côte // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 74. – P. 5524–5532.
- Use of colony-based bacterial strain typing for tracking the fate of *Lactobacillus* strains during human consumption / E. Mahenthiralingam [et al.] // *BMC Microbiology*. – 2009. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/251>.
- Weisburg, W.G. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study / W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier // *J. Bacteriol.* – 1991. – V. 173. – P. 697–703.
- Reed, D.L. Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with ectoparasitic chewing lice of pocket gophers: a culture-independent approach / D.L. Reed, M.S. Hafner // *Microbial Ecol.* – 2002. – V. 44. – P. 78–93.
- Versalovic, J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes / J. Versalovic, T. Koeuth, J.R. Lupski // *Nucl. Acids Res.* – 1991. – V.19. – P. 6823–6831.
- Koeuth, T. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococ-*

cus pneumoniae BOX elements in diverse bacteria / T. Koeuth, J. Versalovic, J.R. Lupski // *Genome Res.* – 1995. – V. 5. – P. 408–418.

10. Genetic relationship in the «*Bacillus cereus* group» by rep-PCR fingerprinting and sequencing of *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment / A. Cherif [et al.] // *Appl. Microbiol.* – 2003. – V. 94. – P. 1108–1119.

11. Xu, D. Sequence diversity of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* sensu lato flagellin (H antigen) protein: comparison with H serotype diversity / D. Xu, J.-C. Côté // *Appl. and Environm. Microbiol.* – 2006 – V. 72 – P. 4653–4662.

12. Бажанов, Д.П. Исследование плазмидной ДНК: учебно-методические рекоменда-

ции к практическим занятиям по курсу «Молекулярная эпидемиология». – Минск: МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 2002. – 20 с.

13. Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis / Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Publications, NY. – 1989. – 468 p.

14. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – V. 4. – P. 406–425.

15. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2007. – V. 24. – P. 1596–1599.

Дата поступления статьи 26 июня 2013 г.

Е.В. Воронкова, Ю.В. Полухович, А.В. Савчук, О.Н. Гукасян, А.П. Ермишин

ПОЛЕВАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИТОФТОРОЗУ ГИБРИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ОПЫЛЕНИЯ ВИДА-ПОСРЕДНИКА *SOLANUM* *VERRUCOSUM* И SvSv-ЛИНИЙ НА ЕГО ОСНОВЕ ДИПЛОИДНЫМИ 1 EBN ВИДАМИ КАРТОФЕЛЯ

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

Введение

Создание устойчивых к комплексу патогенов сортов картофеля с широкой генетической основой – одно из основных направлений в селекции этой культуры. В связи с тем, что генетическая база культурного картофеля относительно узкая, актуальным является ее расширение за счет интрогрессии ценных генов устойчивости к болезням и вредителям от диких видов. Несмотря на большое разнообразие диких и примитивных культурных видов картофеля [1, 2 и др.], в родословной современных сортов представлены лишь некоторые из них [3]. Связано это с тем, что многие виды картофеля практически не изучены, а те из них, у которых обнаружены ценные селекционные признаки, плохо или вообще не скрещиваются с сортами культурного картофеля.

Для преодоления межвидовых репродуктивных барьеров в лаборатории генетики картофеля ГНУ «Институт генетики и цитологии» НАН Беларуси был разработан ряд новых методов, с помощью которых получены уникальные межвидовые гибриды, обладающие высокой устойчивостью к важнейшим болезням. В частности, благодаря использованию вида-посредника *Solanum verrucosum* и SvSv-линий на его основе удалось вовлечь в селекцию дикие диплоидные 1 EBN виды картофеля *S. bul-*

bocastanum, *S. pinnatisectum*, *S. polyadenium*, *S. commersonii*, известные как перспективные источники долговременной R-генной устойчивости к фитофторозу и вирусным болезням [1, 4–9 и др.]. Молекулярно-генетический анализ межвидовых гибридов подтвердил интрогрессию в их геном генетического материала 1 EBN видов [10, 11]. Проведена первичная оценка гибридов по ряду важных для интрогрессивной селекции признаков, таких как способность к формированию клубней в условиях характерного для Беларуси длинного дня, функциональная фертильность пыльцы межвидовых гибридов [12].

Целью настоящей работы являлась оценка полевой устойчивости межвидовых гибридов к фитофторозу картофеля. Такая оценка позволит выделить наиболее устойчивые к патогену генотипы. В ходе дальнейших исследований предполагается изучить генетический контроль выявленной устойчивости, идентифицировать гены, отвечающие за ее формирование. Результатом этих исследований должно стать создание линий-доноров признака и молекулярных маркеров, удобных для использования в селекционном процессе при идентификации новых генов устойчивости к фитофторозу в исходном материале.

Материалы и методы

В качестве материала использовали гибриды F₁, у которых в качестве материнской формы был дикий самосовместимый диплоидный 2 EBN вид картофеля *S. verrucosum* или SvSv-линии, представляющие собой F₂ гибриды между дигаплоидами *S. tuberosum* и *S. verrucosum*, имеющие S-гены в гомозиготном состоянии, полученные от *S. verrucosum*. При

получении данных межвидовых гибридов в качестве опылителей были использованы образцы диких диплоидных 1 EBN видов картофеля из Мексики *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum*, *S. polyadenium* и южноамериканского вида *S. commersonii* [12].

Оценку полевой устойчивости к фитофторозу гибридов осуществляли визуально на

естественном инфекционном фоне по степени поражения болезнью кустов картофеля, произрастающих на экспериментальном поле Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси (г. Минск). Сбор данных проводили 6 раз за сезон вегетации в период с 5 июля по 16 августа 2011 г. (гибриды на основе *S. verrucosum* и SvSv-линий) и с 6 июля по 15 августа 2012 г. (гибриды на основе SvSv-линий) с периодичностью в 7–10 дней. Учитывали площадь поражения листовой и стеблевой поверхности растений (от 0 до 100%). По результатам данных поражения растений фитофторозом за период наблюдения рассчитывали индекс AUDPC (Areal Under Disease

Progress Curve – площадь под кривой нарастания болезни), позволяющий оценить не только абсолютные значения уровня развития заболевания, но и динамику его развития [13]. Индекс AUDPC рассчитывали согласно [14, 15]. Высокоустойчивыми (устойчивость 8,1–9,0 баллов по традиционной 9-балльной шкале) считали гибриды с AUDPC 0,00–0,20 (группа устойчивости 5); устойчивыми (6,1–8,0 баллов) – с AUDPC 0,21–0,40 (группа 4); среднеустойчивыми (4,9–6,0 баллов) – с AUDPC 0,41–0,60 (группа 3); слабоустойчивыми (3,0–4,9 баллов) – с AUDPC 0,61–0,80 (группа 2); неустойчивыми (1,0–2,9 баллов) – с AUDPC 0,81–1,0 (группа 1) [15].

Результаты и обсуждение

Селекционный материал картофеля с интрогрессированными генами от диплоидных 1 EBN видов из Мексики представляет интерес в качестве источников вертикальной устойчивости к фитофторозу за счет *Rpi*-генов, которые, в отличие от давно используемых в селекции *R*-генов гексаплоидного вида *S. demissum*, не обладают выраженной распецифичностью и обеспечивают долговременную устойчивость вне зависимости от расового состава возбудителя фитофтороза. В табл. 1 приведены данные оценки полевой устойчивости к фитофторозу межвидовых гибридов, полученных с использованием вида-посредника *S. verrucosum*. Оценка уровня устойчивости к фитофторозу гибридов между *S. verrucosum* и 1 EBN видами картофеля проводилась нами только в 2011 году, поскольку для этих гибридов было характерно слабое клубнеобразование [12], что не позволило повторить эксперимент в 2012 г. Как видно из представленных данных, в группу устойчивых (AUDPC 4–5, что соответствует по общепринятой шкале 6,1–9,0 баллам устойчивости) попало более 70% всех оцененных гибридов, полученных при опылении *S. verrucosum* разными диплоидными 1 EBN видами картофеля. Появление среди образцов с высокой устойчивостью к фитофторозу (группа AUDPC 5) гибридов с участием мексиканских видов *S. bulbocastanum* и *S. pinnatisectum* вполне закономерно. Эти виды рассматриваются в литературе как наиболее перспективные источники долго-

временной устойчивости к фитофторозу. Южноамериканский вид *S. commersonii* по данным [3] также можно отнести к видам, представляющим интерес в качестве источника генов устойчивости к фитофторозу (при многолетних испытаниях суммарная устойчивость различных популяций этого вида оказалась на уровне устойчивых и высоко устойчивых генотипов). *S. polyadenium* в этих же испытаниях проявил себя как вид со средней устойчивостью к фитофторозу (6,7 балла по 9-балльной шкале). Очевидно, это обстоятельство является причиной формирования самой незначительной доли высоко устойчивых генотипов с участием *S. polyadenium* среди испытанных нами гибридов *S. verrucosum* × 2х 1 EBN-виды. В пределах этого вида была отмечена высокая вариация признака (коэффициент вариации 26,9). Поэтому, видимо, в потомстве *S. polyadenium*, как, впрочем, и в потомстве *S. commersonii*, наряду с устойчивыми присутствовали также и слабо устойчивые (на уровне 3–4 баллов по 9-балльной шкале) генотипы. При получении межвидовых гибридов каждый из 1 EBN видов был представлен одновременно несколькими различными генотипами, взятыми от разных коллекционных образцов, пыльца которых была включена в соответствующую виду-опылителю смесь пыльцы. Поэтому в качестве отцовской формы полученных гибридов могли быть генотипы с разным уровнем устойчивости к фитофторозу.

Таблица 1

Распределение гибридов между *S. verrucosum* и диплоидными 1 EBN видами картофеля по признаку «полевая устойчивость к фитофторозу» (Минск, 2011 г.)

Гибриды*	Количество, шт.	Группа AUDPC									
		5		4		3		2		1	
		A**	B***	A	B	A	B	A	B	A	B
ver × blb	8	2	25,0	5	62,5	1	12,5	0	0,0	0	0,0
ver × pnt	12	4	33,3	6	50,0	2	16,7	0	0,0	0	0,0
ver × pld	13	2	15,4	5	38,5	5	38,5	1	7,7	0	0,0
ver × cmm	12	4	33,3	4	33,3	3	25,0	1	8,3	0	0,0
Все гибриды ver × 2x 1 EBN	45	12	26,7	20	44,4	11	24,4	2	4,4	0	0,0

*ver – *S. verrucosum*; blb – *S. bulbocastanum*; pnt – *S. pinnatisectum*; pld – *S. polyadenium*; cmm – *S. commersonii*; 2x 1 EBN – все диплоидные 1 EBN виды, использованные в скрещиваниях;

**А – количество генотипов данной группы AUDPC (шт.);

***В – доля в гибридной популяции (%).

По-видимому, существенный вклад в формирование высокой или очень высокой устойчивости к фитофторозу гибридов вносит и материнский вид *S. verrucosum*, многие образцы которого, согласно [3, 16], могут служить в качестве источников генов устойчивости к фитофторозу. В частности, в результате пяти лет испытаний в РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» большого числа генотипов этого вида, взятых из разных источников, была показана их суммарная устойчивость на уровне 8,4 балла, то есть они относились к группе высокоустойчивых [3]. Этот вид отличался одним из наиболее низких коэффициентов вариации по данному признаку. Таким образом, ценность *S. verrucosum* при вовлечении в генетический пул культурного картофеля генофонда диких видов состоит не только в использовании его в качестве вида-посредника, но также и источника важных для селекции генов. Однако существенной проблемой использования в селекции гибридов между *S. verrucosum* и диплоидными 1 EBN видами картофеля является низкий уровень клубнеобразования у гибридов, что ведет к потере большей части селекционного материала при полевых испытаниях, предшествующих отбору генотипов для дальнейшей гибридизации и, тем самым, снижает селекционную ценность таких гибридов.

Решением проблемы слабого клубнеобразования межвидовых гибридов с участием 1 EBN диплоидных видов может быть использование в качестве вида-посредника не дикого вида *S. verrucosum*, а созданных на его основе диплоидных линий культурного картофеля, так называемых SvSv-линий [17]. Гибриды между SvSv-линиями и 1 EBN дикими видами картофеля лучше приспособлены к климатическим условиям Беларуси (умеренные широты, длинный летний день), так как создаются на основе дигамплоидов *S. tuberosum* – вида имеющего длительную историю выращивания и селекции на хорошее клубнеобразование в умеренных широтах. В силу этого межвидовые гибриды на основе SvSv-линий обладают более высокой, по сравнению с гибридами *S. verrucosum*, способностью образовывать клубни. Несмотря на то, что среди гибридов с участием SvSv-линий также наблюдалась достаточно большая часть генотипов, не формирующих клубни [12], нам удалось сохранить достаточное количество гибридов для проведения многолетних испытаний. Оценка полевой устойчивости к фитофторозу в разные годы важна для отбора генотипов с устойчивостью к фитофторозу без выраженного распецифического характера. Такая R-генная устойчивость представляет наибольший интерес для селекции. В табл. 2 представлены результаты испытаний полученных на основе SvSv-линий межвидовых гибридов в 2011 и 2012 гг.

Таблица 2

Распределение гибридов между SvSv-линиями и диплоидными 1 EBN видами картофеля по признаку «полевая устойчивость к фитофторозу» (Минск, 2011, 2012 гг.)

Гибриды*	Количество, шт.	Группа AUDPC									
		5		4		3		2		1	
		А**	В***	А	В	А	В	А	В	А	В
2011 г.											
SvSv × blb	126	45	35,7	43	34,1	33	26,2	5	4,0	0	0,0
SvSv × pnt	139	45	32,4	41	29,5	27	19,4	17	12,2	9	6,5
SvSv × pld	59	23	39,0	20	33,9	10	17,0	3	5,1	3	5,1
SvSv × cmm	11	1	9,1	4	36,4	4	36,4	0	0,0	2	18,2
Все гибриды SvSv × 2x 1 EBN	335	114	34,0	108	32,2	74	22,1	25	7,5	14	4,2
2012 г.											
SvSv × blb	61	10	16,4	15	24,6	12	19,7	10	16,4	14	23,0
SvSv × pnt	79	12	15,2	31	39,2	10	12,7	8	10,1	18	22,8
SvSv × pld	30	3	10,0	6	20,0	5	16,7	4	13,3	12	40,0
SvSv × cmm	7	2	28,6	2	28,6	1	4,3	1	14,3	1	14,3
Все гибриды SvSv × 2x 1 EBN	177	27	15,3	54	30,5	28	15,8	23	13,0	45	25,4

* SvSv – SvSv линии, ver – *S. verrucosum*; blb – *S. bulbocastanum*; pnt – *S. pinnatisectum*; pld – *S. polyadenium*; cmm – *S. commersonii*; 2x 1 EBN – все диплоидные 1 EBN виды, использованные в скрещиваниях;

**А – количество генотипов данной группы AUDPC (шт.);

***В – доля в гибридной популяции (%).

Результаты двух лет испытаний гибридов, полученных на основе SvSv-линий, показали, что их использование для передачи признака устойчивости к фитофторозу от диких видов обладает высокой эффективностью. Хотя, в отличие от селекционного материала на основе *S. verrucosum*, среди гибридов, полученных с участием SvSv-линий, наблюдали появление неустойчивых (группа 1 AUDPC) образцов, их количество, особенно в первый год испытаний, было невелико (менее 5%), а в потомстве от опыления SvSv-линий *S. bulbocastanum* они отсутствовали полностью.

До половины генотипов гибридных популяций наследовали высокий уровень полевой устойчивости к фитофторозу и в 2012 году, который отличался более значительной поражаемостью растений фитофторозом, чем 2011 г. Так, 41% гибридов на основе *S. bulbocastanum* в 2012 г. был отнесен к устойчивым (4 группа AUDPC) и высоко устойчивым к патогену

(5 группа AUDPC). Доля устойчивых гибридов на основе *S. pinnatisectum* составила более 54%. Наиболее высокая частота устойчивых генотипов в 2012 г. была среди гибридов с участием *S. commersonii*. Однако небольшая выборка генотипов, оцененных в ходе испытаний, не дает оснований считать этот вид картофеля более эффективным источником генов устойчивости к фитофторозу, чем *S. bulbocastanum* или *S. pinnatisectum*.

Наличие значительной доли генотипов с очень высокой устойчивостью (более 8 баллов по 9-балльной шкале) среди гибридов, полученных при скрещивании *S. bulbocastanum*, как с *S. verrucosum*, так и SvSv-линиями, было вполне ожидаемым. У семи из восьми генотипов дикого вида, пыльца которых вошла в смесь для опыления, нами отмечено наличие ПЦР-маркера высокоэффективного гена устойчивости к фитофторозу *Rpi-blb1* [10]. По-видимому, следует ожидать выявления вы-

сокоэффективных генов устойчивости к фитофторозу у *S. pinnatisectum* и *S. commersonii*. Об этом свидетельствует количество высокоустойчивых генотипов у гибридов с участием этих видов, сопоставимое с отмеченным у гибридов на основе *S. bulbocastanum*. Наименьшее количество устойчивых генотипов было среди гибридов на основе *S. polyadenium*. Однако и в данном случае устойчивыми оказались около трети оценивавшихся генотипов.

Снижение доли устойчивых генотипов и одновременное повышение доли неустойчивых во второй год испытаний в популяции гибридов, полученных на основе SvSv-линий, может быть связано с несколькими причинами. Во-первых, различия могут быть обусловлены изменением интенсивности воздействия внешних факторов среды на развитие патогена, во-вторых, не исключена вариабельность в расовом составе гриба. В этом случае снижение уровня устойчивости должно проявляться у тех генотипов, устойчивость которых носит полигенный характер или определяется наличием расоспецифических *Rpi*-генов, родственных описанному у *S. demissum* [5, 18]. Например, известен расоспецифический характер взаимодействия с патогеном картированного у *S. bulbocastanum* гена *Rpi-blb3* [19]. Снижение числа устойчивых генотипов в оцениваемой гибридной популяции может быть связано и с определенной количественной потерей в ней генотипов из-за отсутствия клубнеобразования у части устойчивых к фитофторозу гибридов. Отсутствие клубнеобразования в большинстве случаев являлось следствием

замедленного развития растений и их позднеспелостью, вызванной наличием у них генетического материала генов диких видов, относящихся к короткодневным видам картофеля. Таким образом, снижение уровня устойчивости в популяции межвидовых гибридов может быть обусловлено и негативным влиянием интрогрессированного генетического материала диких видов (отсутствие завязывания клубней, очень длинный период покоя клубней, позднеспелость). Тем не менее, во всех гибридных популяциях, полученных на основе SvSv-линий, были выделены генотипы со стабильно высокой и стабильно низкой устойчивостью, которые могут послужить родительскими образцами для получения расщепляющихся популяций, предназначенных для маркирования и картирования новых *Rpi*-генов.

Хотя частота высокоустойчивых и устойчивых к фитофторозу гибридов в популяциях, полученных на основе SvSv-линий несколько ниже, чем среди гибридов на основе *S. verrucosum*, при использовании для вовлечения в селекцию диплоидных 1 EBN видов картофеля первые, по нашему мнению, более перспективны. Они несут большее количество признаков культурного картофеля и меньшее количество нежелательных для селекции признаков дикого вида. Поэтому при создании на их основе продвинутого селекционного материала потребуется меньше циклов беккрасса культурным картофелем. Это свойство SvSv-линий может быть усилено в ходе специальной селекции, включающей их беккроссирование дигаплоидами *S. tuberosum* в сочетании с отбором гомозигот SvSv.

Заключение

В результате двухлетней оценки межвидовых гибридов картофеля, полученных при опылении вида-посредника *S. verrucosum* и SvSv-линий на его основе диплоидными 1 EBN видами картофеля *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum*, *S. polyadenium* и *S. commersonii*, показана высокая наследуемость межвидовыми гибридами признака полевой устойчивости к фитофторозу, интрогрессированного от 1 EBN диких видов. Несмотря на более высокую частоту устойчивых генотипов (8,1–9 баллов по 9-балльной шкале) среди межвидовых гибридов на основе *S. verrucosum*, по сравнению с гибридами на

основе SvSv-линий, последние представляются более перспективными для интрогрессии R-генной устойчивости к фитофторозу от диплоидных 1 EBN видов в селекционный материал. При относительно большой доле этих гибридов (более трети популяции) устойчивых (6,1–8 баллов) и высокоустойчивых (8,1–9 баллов) генотипов, они несут большее количество признаков культурного картофеля, в частности способность к стабильному клубнеобразованию в условиях длинного дня. Несмотря на изменчивость уровня устойчивости к фитофторозу в гибридных популяциях в разные годы испытания, среди гибридов

на основе SvSv-линий выделены образцы со стабильно высокой и стабильно низкой устойчивостью к фитофторозу. Такие генотипы могут быть использованы в качестве родительских форм при создании расщепляющихся гибридных популяций, предназначен-

ных для маркирования и картирования новых *Rpi*-генов, интрогрессированных в селекционный материал от диплоидных 1 EBN видов картофеля. Полученный материал является источником генов высокой устойчивости картофеля к фитофторозу.

Список использованной литературы

1. Hawkes, J.G. The Potato: Evolution, biodiversity and genetic resources / J.G. Hawkes. – London : Belhaven Press, 1990. – 259 p.
2. Горбатенко, Л.Е. Конспект системы секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L. из Южной Америки / Л.Е. Горбатенко // Сборник научных трудов по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Ленинград: Мир, 1984. – С.92–108.
3. Ермишин, А.П. Картофель / А.П. Ермишин, Е.В. Воронкова, В.А. Козлов // Генетические основы селекции растений Т. 2. Частная генетика растений / под науч. ред. А.В. Кильчевского, Л.В. Хотылевой. – Минск: Беларус. навука, 2010. – С. 156–234.
4. Иванюк, В.Г. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В.Г. Иванюк, С.А. Банадысев, Г.К. Журомский. – Минск: Белпринт, 2005. – 696 с.
5. Росс, Х. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы (пер. с англ.) / Х. Росс – М.: Агропромиздат, 1989. – 183 с.
6. Yermishin, A.P. The development of initial parental material for breeding disease resistant potatoes at the diploid level / A.P. Yermishin. // Plant Breeding and Seed Science. – 2000. – Vol. 44, N 2. – P. 105–115.
7. Swiezynski, K.M. Breeding potato cultivars with tubers resistant to *Phytophthora infestans* / K.M. Swiezynski, E. Zimnoch-Guzowska // Potato Research. – 2001. – Vol. 44. – P. 97–117.
8. Zoteyeva, N.M. Evaluation of wild potato species adapted to long day condition for resistance to *Phytophthora infestans* and other valuable traits. / N.M. Zoteyeva // Breeding and adaptation of potatoes. Abstracts of EAPR conference papers and posters (26–30th July, 2003, Oulu, Finland). – 2003. – P. 10.
9. Sliwka, J. Genetic factors encoding resistance to late blight caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary on the potato genetic map / J. Sliwka // Cell. Mol. Biol. Let. – 2004. – Vol. 9. – P. 855–867.
10. Полухович, Ю.В. Интрогрессия специфических локусов дикого вида картофеля *Solanum bulbocastanum* в межвидовые гибриды / Ю.В. Полухович, Е.В. Воронкова, А.П. Ермишин // Материалы I конференции молодых ученых Украины с международным участием «Биология растений и биотехнология», 5–7 октября 2011 г., ИПБГ, Белая Церковь, Украина. – Белая Церковь: ИПБГ – С. 62.
11. Yermishin, A.P. A new look at the problem of inter-EBN interspecific crosses in potato / A.P. Yermishin [et al.] / In: EAPR 2011 (Abstracts of the 18th Triennial Conference of the European Association for Potato Research July 24–29, 2011 Oulu, Finland), J. Santala and J.P.T. Valkonen (eds.). – Helsinki, Finland, 2011. – P. 71.
12. Полухович, Ю.В. Характеристика гибридов между 2 EBN видом-посредником *Solanum verrucosum* и 1 EBN диплоидными видами картофеля / Ю.В. Полухович [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. трудов / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2012. – С. 55–63.
13. Shaner, G. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildening resistance in knox wheat / G. Shaner, R.E. Finney // Phytopathology. – 1977. – Vol. 67. – P. 1051–1056.
14. Shaw, M.W. Pathogen population dynamics / M.W. Shaw, G. Shaner, R.E. Finney // The epidemiology of plant diseases (B.M. Cooke, D. Gareth Jones and B. Kaye eds.). – Springer, 1998. – P.193–214.
15. Jenkins, J.C. Classifying the relative host reaction in potato cultivars and breeding lines to the US-8 strain of *Phytophthora infestans* in Minnesota / J.C. Jenkins, R.K. Jones // Plant Disease. – 2003. – Vol. 87, N 8. – P. 983–990.
16. Устойчивость образцов диких видов картофеля к болезням и вредителям. Каталог

мировой коллекции ВИР / С.Д. Киру [и др.]; ВИР им. Н.И. Вавилова. – Санкт-Петербург, 2004. – Вып. 761. – 56 с.

17. Полюхович, Ю.В. Создание линий-посредников для преодоления межвидовой несовместимости у картофеля / Ю.В. Полюхович [и др.] // Вести НАН Беларуси, сер. биол. наук. – 2010, № 2. – С. 51–58.

18. Gebhardt, C. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome / C. Gebhardt, J.P.T. Valkonen // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2001. – Vol. 39. – P. 79–102.

19. Lokossou, A.A. Diversity, distribution and evolution of *Solanum bulbocastanum* late blight resistance genes / A.A. Lokossou [et al.] // *Mol. Plant. Microbe Interact.* – 2010. – Vol. 23, N 9. – P. 1206–1216.

Дата поступления статьи 18 июня 2013 г.

РЕФЕРАТЫ

SUMMARIES

УДК 575/576(476)(092)+929

Хотылева, Л.В. Жизненный и творческий путь академика Петра Фомича Рокицкого / Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский, И.Б. Моссе // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 7–15.

15 августа 2013 г. исполнилось 110 лет со дня рождения выдающегося сына белорусского народа академика АН Беларуси, лауреата Государственной премии, заслуженного деятеля науки, первого президента Белорусского общества генетиков и селекционеров Петра Фомича Рокицкого. Он внес существенный вклад в становление и дальнейшее развитие общей и теоретической генетики, радиационной генетики, теории мутагенеза, теории отбора, теоретических основ селекционного процесса, биологической статистики. Широко известны его работы по вопросам философии, истории биологии и генетики. Петр Фомич оставил после себя не только научные труды и идеи, но и достойных учеников – кандидатов и докторов наук. Исследования, начатые под руководством П.Ф. Рокицкого, в настоящее время приобретают все большую актуальность, расширяются и углубляются на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Ключевые слова: академик П.Ф. Рокицкий, биография, генетика, биологическая статистика.

Khotyleva, L. The life path and creative way of academician Petr Fomich Rokitski / L. Khotyleva, A. Kilcheusky, I. Mosse // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 7–15.

August 15, 2013 is 110th anniversary of Petr Fomich Rokitski, the distinguished son of the Belarusian people, academician of the Academy of Sciences of Belarus, Laureate of the State Prize, Honored worker of science, the first president of the Belarusian Society of Geneticists and Breeders. He has made a significant contribution to the establishment and further development of general and theoretical genetics, radiation genetics, mutagenesis theory, the theory of selection, the theoretical foundations of the selection process, biological statistics. P.F. Rokitski is widely known for his work on philosophy, history, biology and genetics. Petr Fomich left a lot of scientific works and ideas as well as his students and followers. Research started under the leadership of P.F. Rokitski, is now becoming increasingly important, expanding and deepening at the Institute of Genetics and Cytology at the NASB.

Key words: academician P.F. Rokitski, biography, genetics, biological statistics.

УДК 631.524.86:635.21:632.4

Волуевич, Е.А. Генетические подходы в селекции картофеля на устойчивость к вирусам / Е.А. Волуевич, Н.В. Павлючук // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 16–25.

Современные сорта картофеля должны обладать генетической устойчивостью к вирусам. В Республике Беларусь, как в стране, производящей картофель в значительных объемах, вирусозы встречаются достаточно широко. Они вызываются различными видами патогенов, в том числе Y-, X-, S-, M- и L- вирусами. Для эффективной селекции сортов на вирусоустойчивость необходимо располагать источниками резистентности с известными генами, к которым уже разработаны молекулярные маркеры. Маркер-сопутствующая селекция позволяет создавать сорта с групповой устойчивостью к различным вирусам и быстро проводить целенаправленный отбор желаемых генотипов. В статье приводятся данные о типах устойчивости картофеля к вирусам и известных генах резистентности к разным видам этих патогенов. Рассматриваются механизмы взаимодействия некоторых вирусов с растением-хозяином, в том числе с позиции длительности устойчивости.

Ключевые слова: картофель, вирусы, типы устойчивости, гены, селекция.

Voluevich, E. Genetic approaches to potato breeding virus resistance / E.A. Voluevich, N. Pavlyuchuk // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 16–25.

The modern varieties of potatoes should have a genetic resistance to viruses. In Belarus, a country producing potatoes in large volumes, viral diseases are widespread. They are caused by different species of pathogens, including Y-, X-, S-, M- and L- viruses. For effective selection of varieties to be available sources with known resistance genes to viruses, which already have developed molecular markers. Marker - assisted selection allows to create varieties with combined

resistance to various viruses and quickly carry out purposeful selection desired genotypes. The article presents data on the types of potato virus resistance, known resistance genes to different species. The mechanisms are considered of interaction of some viruses with the host plant, including the perspective of long-term resistance to viral diseases.

Key words: potato viruses, types of resistance genes, selection.

УДК 578.52

Кузмицкая, П.В. Идентификация вируса хлоротической пятнистости листьев яблони методом ОТ-ПЦР / П.В. Кузмицкая, О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 26–32.

Метод ОТ-ПЦР был применен для тестирования некоторых сортов яблони, выращиваемых в Беларуси, на наличие вируса хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV). Вирус был обнаружен у 11 сортов. Из яблони сорта Сакавіта был выделен и клонирован фрагмент ACLSV. Последовательность представляет собой фрагмент гена вируса, кодирующего капсидный белок и последующий 3'-нетранслируемый регион. Идентичность клонированной нуклеотидной последовательности отдельным последовательностям данной области генома вируса, представленным в базе данных GenBank, находится в пределах 87–94%.

Ключевые слова: яблоня, вирус хлоротической пятнистости листьев яблони, молекулярные маркеры, ген, кодирующий белок капсида, анализ нуклеотидной последовательности.

Kuzmitskaya, P. RT-PCR identification of Apple chlorotic leaf spot virus / P. Kuzmitskaya, O. Urbanovich, Z. Kozlovskaya // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 26–32.

Apple trees of different cultivars growing in Belarus were tested using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), an important economically and common pathogens in commercial orchards. Specificity of molecular markers was confirmed by sequencing the RT-PCR products. The nucleotide and deduced amino acid sequences were compared with sequences published in GenBank. Sequence analysis demonstrated that studied sequence is a part of coat protein gene (CP) of ACLSV. Aligning this nucleotide sequence with other CP sequences from GenBank showed 87–94% identity.

Key words: apple, apple chlorotic leaf spot virus, molecular markers, gene of coat protein, analysis of nucleotide sequence.

УДК 577.21:575:616.62-006.6

Савина, Н.В. Изучение аллельного полиморфизма гена *TNF-α* при раке мочевого пузыря / Н.В. Савина // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 33–38.

Проанализировано распределение частот аллельных вариантов и полиморфных генотипов в положении -308 промотора гена *TNF-α* у здоровых лиц и пациентов с установленным диагнозом «рак мочевого пузыря» (РМП) в Республике Беларусь. Частоты изученных генотипов у представителей населения Беларуси не отличались от этого показателя в европеоидных популяциях. Распределения частот аллелей и полиморфных генотипов в обследованных группах в целом и с учетом статуса курения достоверно не различались.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, ген *TNF-α*, фактор некроза опухолей, полиморфизм -308 G/A.

Savina, N. The study of the gene *TNF-α* polymorphism in the bladder cancer / N. Savina // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 33–38.

The distribution of allele variants and polymorphic genotypes at the position -308 of the gene *TNF-α* promoter was analyzed in healthy individuals and bladder cancer (BC) patients in the Republic of Belarus. The frequencies of genotypes studied in Belarusians did not differ from the data in the Europeans. The distribution of frequencies of alleles and polymorphic genotypes did not differ in the groups studied as a whole and taking into account the smoking status.

Key words: bladder cancer, gene *TNF-α*, tumor necrosis factor, polymorphism -308 G/A.

УДК 631.522:635.21

Ермишин, А.П. Мейотическое удвоение хромосом в селекции картофеля с использованием отбора на диплоидном уровне / А.П. Ермишин // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 39–47.

В обзоре представлены данные литературы и результаты собственных исследований автора по проблеме получения на заключительных этапах селекции картофеля на диплоидном уровне дигаметоидов, пригодных к мейотическому удвоению хромосом. Отмечено, что естественный уровень диплоидных генотипов картофеля, способных формировать с достаточно высокой частотой фертильную нередуцированную пыльцу, как правило, является недостаточным для успешного применения названной технологии. В результате специальной селекции созданы линии-доноры признаков фертильности, использование которых в скрещиваниях со стерильными дигаметоидами позволяет получать фертильное потомство. При проведении селекции на диплоидном уровне возможно поддерживать приемлемый уровень мужской фертильности, избегая гибридизации с мужски стерильными формами и поддерживая, по возможности, высокий уровень гетерозиготности селекционного материала. Для того, чтобы на завершающем этапе диплоидной селекции получить гибриды, способные формировать функционально фертильную нередуцированную пыльцу с достаточной для мейотического удвоения хромосом частотой, необходимо, чтобы оба родителя имели этот признак. Следовательно, гены, связанные с формированием $2n$ пыльцы, должны быть введены в генетический пул селекционного материала на ранних этапах диплоидной селекции: при гибридизации первичных дигаметоидов сортов с линиями-донорами фертильности или при гибридизации дигаметоидов с дикими видами.

Ключевые слова: картофель, отбор на диплоидном уровне, мейотическое удвоение хромосом, нередуцированные гаметы, функциональная фертильность пыльцы.

Yermishin, A. Meiotic chromosome doubling in potato breeding with the use of selection at the diploid level / A. Yermishin // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 39–47.

Literature data and the results of the own investigations are presented in the review devoted to the problem of production at last stages of breeding potato at the diploid level of dihaploids feasible for meiotic chromosome doubling. It was highlighted that natural level of diploid potato genotypes able to form with acceptable frequency unreduced pollen is, as a rule, insufficient for successful use of the above mentioned technology. As the result of special breeding there were produced fertility donor lines, use of that in crosses with sterile dihaploids makes possible to produce fertile offspring. It is possible to maintain acceptable level of male fertility of dihaploids during “diploid” breeding if to avoid hybridization with male sterile genotypes and to keep up high level of heterozygosity of the material. To produce at the last stages of “diploid” potato breeding the hybrids are able to form fertile unreduced pollen with sufficient for meiotic chromosome doubling frequency it is necessary that both parents have this character. Hence, genes associated with $2n$ pollen formation would be introduced into genetic pool of breeding material at the early stages of “diploid” breeding, i.e. in hybridization between initial dihaploids and fertility donor lines or in hybridization between dihaploids and wild potato species.

Key words: potato, breeding at the diploid level, meiotic chromosome doubling, unreduced gametes, functional fertility of pollen.

УДК 575.222.78: [633.11+633.14]

Орловская, О.А. Анализ связи между гетерозисом и трансгрессивной изменчивостью по признакам продуктивности у гибридов ярового тритикале / О.А. Орловская, Л.В. Хотылева // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 48–53.

В результате изучения гетерозиса и трансгрессивной изменчивости ярового тритикале у большинства гибридов, полученных на основе 9 генотипов, различающихся по уровню генетических дистанций, обнаружен гетерозисный эффект в F_1 и положительное трансгрессивное расщепление в F_2 по продуктивной кустистости, числу и массе зерна главного колоса, массе зерна с растения. Однако четкой зависимости между уровнем проявления гетерозиса в F_1 и показателями трансгрессивной изменчивости в F_2 обнаружено не было.

Выделены гибриды с высокой степенью трансгрессии и большой частотой выщепления высокопродуктивных растений по основным признакам продуктивности. Установлено, что большинство данных генотипов создано на основе сорта тритикале Матейко и линий 3(9), 49(10).

Ключевые слова: тритикале, гетерозис, трансгрессивная изменчивость.

Orlovskaya, O. Analysis of the relationship between heterosis and transgressive variation for productivity in spring triticale hybrids / O. Orlovskaya, L. Khotyleva // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 48–53.

The study of heterosis and transgressive variation of spring triticale has confirmed heterosis effect in F_1 and positive transgression in F_2 for productive tillering, number and weight of grains of main spike, grain weight of plant in most hybrids derived from crosses of 9 genetically distant genotypes. However, significant correlation between heterosis in F_1 and transgressive variation in F_2 was not found.

Hybrids with high degree and frequency of transgression of the main features of plant productivity were identified. It is established that most of these genotypes are based on the variety Mateiko and lines 3(9), 49(10).

Key words: triticale, heterosis, transgressive variation.

УДК 576.316.3:[633.11+633.14]: 577.21

Сравнительный анализ полиморфизма локусов хромосомы 5А у пшеницы и тритикале с использованием SSR-маркеров / Е.В. Антоненко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 54–63. – Соавт.: В.А. Лемеш, Е.М. Кременевская, Н.М. Ермашина, О.И. Зайцева.

С использованием молекулярных маркеров проведен сравнительный анализ полиморфизма 10 микросателлитных локусов (*Xgwm304*, *Xgwm415*, *Xgwm154*, *Xgwm205*, *Xgwm293*, *Xgwm156*, *Xgwm595*, *Xgwm186*, *Xgwm126*, *Xgwm291*), расположенных на 5А хромосоме у 2 сортов мягкой яровой пшеницы белорусской селекции (Рассвет, Ростань) и 2 линий удвоенных гаплоидов мягкой яровой пшеницы (Dh 52-02-06, Dh 48-02-06). В результате исследования выявлено наличие межлинейного полиморфизма по 3 локусам: *Xgwm186*, *Xgwm291* и *Xgwm595*, которые были использованы для оценки полиморфизма у 65 растений отдаленных гибридов гексаплоидного тритикале и пшеницы (Лотас × P-2; КСИ 18/05 × Ростань; КСИ 18/05 × Ростань; Лана × P19; Лотас × Рассвет) и их родительских форм (тритикале – сорта: Лана, Лотас, сортообразец КСИ 18/05; пшеница – сорт Рассвет, сортообразцы: P-2, P-19). У исследованных генотипов тритикале и отдаленных гибридов обнаружен полиморфизм по локусу *Xgwm186*. Показана возможность использования праймеров, подобранных для пшеницы, при оценке полиморфизма у тритикале.

Ключевые слова: пшеница, тритикале, хромосомы, SSR-маркеры.

The comparative analysis of polymorphism of triticale and wheat chromosome 5 loci using SSR-markers / E. Antonenko [et.al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 54–63. – V. Lemesh, E. Kremenevskaja, N. Yermishina, O. Zaitseva.

The comparative polymorphism analysis of 10 microsatellite loci (*Xgwm304*, *Xgwm415*, *Xgwm154*, *Xgwm205*, *Xgwm293*, *Xgwm156*, *Xgwm595*, *Xgwm186*, *Xgwm126*, *Xgwm291*) located on the 5A chromosome of two Belarusian cultivars of soft wheat (Рассвет, Ростань) and two double haploids of soft spring Belarusian wheat (Dh 52-02-06, Dh 48-02-06) was conducted using molecular markers. As a result the interline polymorphism was detected in 3 loci: *Xgwm186*, *Xgwm291* and *Xgwm595*.

These loci were used in order to estimate polymorphism level in 65 plants of hexaploid triticale and wheat remote hybrids (Лотас × P-2; КСИ 18/05 × Ростань; КСИ 18/05 × Ростань; Лана × P19; Лотас × Рассвет) and their parental lines (тритикале – cultivars: Лана, Лотас, with КСИ 18/05; wheat – cultivar Рассвет, varieties: P-2, P-19). The polymorphism was detected for locus *Xgwm186* of studied triticale and remote hybrids genotypes. The opportunity to use primers selected for wheat in order to estimate polymorphism level in triticale was demonstrated.

Key words: wheat, triticale, chromosomes, SSR-markers.

УДК 631.528.2:633.14.324

Дупликация генома озимой ржи (*Secale cereale* L.) с использованием закиси азота (N_2O) / Н.Б. Белько [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 64–74. – Соавт.: И.С. Гордей, И.А. Гордей, Э.П. Урбан.

Изложен усовершенствованный метод дупликации (полиплоидизации) в зиготе генома диплоидных сортов и гибридов ржи с использованием полиплоидизирующего реагента закиси азота (N_2O). Показана высокая эффективность дупликации генома в первом делении зиготы озимой ржи закисью азота. Выход тетраплоидов достигал 85,7% и составил в среднем 43,4% при относительно низком уровне содержания анеуплоидов (1,6–8,1%). На основании исследований эффектов дупликации генома на клеточном (кариотип, процесс мейоза, фертильность пыльцы), белковом (полиморфизм секалинов) и молекулярном уровне (полиморфизм ядерной ДНК) установлены изменения мейоза, экспрессии генов видоспецифических запасных белков семян и полиморфизма ДНК. Дана

селекционно-генетическая характеристика созданного генофонда и нового сорта тетраплоидной ржи, полученного в результате дупликации генома закисью азота (N₂O).

Ключевые слова: рожь, дупликация генома, тетраплоиды, закись азота, секалины, полиморфизм ДНК.

Genome duplication of winter rye (*Secale cereale* L.) using nitrous oxide (N₂O) / N. Belko [et al.]// Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 64–74. – I.S. Gordei, I.A. Gordei, E. Urban

An improved method of duplication (polyploidization) of diploid varieties and hybrids genomes of rye in the zygote stage using poliploidization agent nitrous oxide (N₂O) state in this article. The high efficiency of genome duplication of winter rye in the first zygote division by nitrous oxide was shown. The content of tetraploids reached 85.7% and averaged 43.4% with a relatively low content of aneuploids (1,6–8,1%). Based on studies of the genome duplication effects on the cellular (karyotype, the process of meiosis, pollen fertility), protein (polymorphism of secalins) and the DNA level (nuclear DNA polymorphisms) are set meiosis changes, species-specific gene expression of seed storage proteins changes and DNA polymorphism changes. Breeding and genetic characteristic of the new genofund and the new tetraploid cultivar of rye, created by the genome duplication using nitrous oxide (N₂O).

Key words: rye, genome duplication, tetraploids, nitrous oxide, secalins, DNA polymorphism.

УДК 633.52 – 575.113:577.21

Генетический полиморфизм сортов льна (*Linum usitatissimum* L.) в зависимости от периода селекции / В.А. Лемеш [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 75–86. – Соавт.: М.В. Богданова, Е.В. Гузенко, З.Е. Грушецкая, В.И. Сакович, Т.Е. Саматадзе, О.А. Рачинская, О.В. Муравенко

Выявлено 156 аллелей 20 SSR-локусов у 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси. Максимальное число аллелей (12) определено для локуса Lu13, минимальное (3 аллеля) установлено для локуса Flu24. Уровень полиморфизма для данной выборки: значения PIC варьировали от 0,526 до 0,869 (в среднем 0,744). Выявлено 65 редких аллелей у 31 сорта, из них 16 сортов (41% выборки) имели уникальные аллели. Для выборки из 15 стародавних белорусских сортов и примитивных образцов (ландрасы) по тем же 20 SSR-локусам выявлено 143 аллеля. Максимальное число аллелей (16) определено для локуса Flu25, минимальное (2 аллеля) – для локуса Flu24. Уровень полиморфизма для данной выборки: значения PIC варьировали от 0,480 до 0,918 (в среднем 0,764). Выявлено 66 редких аллелей, причем редкие аллели имели все сорта выборки, а уникальные аллели обнаружены у 14 сортов (93% выборки).

Изученные выборки характеризовались высокой частотой встречаемости редких аллелей – больше 40%. Однако частота встречаемости уникальных аллелей в выборке из 15 белорусских стародавних сортов льна (28%) была достоверно выше, чем в выборке 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси (19,2%).

Селекционные сорта льна, включенные в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси до 2000 года, имели достоверно ($P < 0,05$) более низкие значения показателей генетического полиморфизма по сравнению с белорусскими стародавними сортами и современными селекционными сортами, включенными в госреестр после 2000 года.

Ключевые слова: *Linum usitatissimum* L., генетический полиморфизм, SSR-анализ, PIC, метод бутстреп-размножения выборок.

Genetic polymorphism of flax varieties (*Linum usitatissimum* L.) depending on selection period / V.A. Lemesh [et al.]// Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 75–86. – M. Bogdanova, Ye. Guzenko, Z. Grushetskaya, V. Sakovich, T. Samatadze, O. Rachinskaya, O. Muravenko

During this study 20 SSR-loci of 156 alleles in 39 varieties of flax were found, all included in National Registry of Varieties and Hardy-Shrub Species of Belarus. Maximal amount of alleles (12 alleles) was identified for locus Lu13, minimal (3 alleles) – for locus Flu24. The polymorphism level for samples under study: the PIC value varied from 0,526 to 0,869 (at the average 0,744). Sixty five rare alleles were revealed in 31 varieties, with 16 varieties among them having unique alleles (41% of the samples).

As a result of SSR-analysis of the samples of 15 age-old Belarusian varieties and primitive samples (landraces) with the same 20 primers 143 alleles were identified. Maximal amount of alleles (16 alleles) was detected for locus Flu25, minimal (2 alleles) – for locus Flu24. The polymorphism level for samples under study: the PIC value varied from 0,48 to 0,918 (at the average 0,764). Sixty six rare alleles were found. All the samples had rare alleles. The unique alleles were identified only in 14 varieties (93% of the samples).

The studied samples were characterized with a high frequency index for rare alleles – more than 40%. However, the frequency index for rare alleles in the sample of 15 Belarusian old-age varieties of flax (28%) was higher (statistically significant data) than in the sample of 39 flax varieties, included in National Registry of Varieties and hurdy-shrub species of Belarus (19,2%).

Selected flax varieties, included in National Registry of Varieties and Hurdy-Shrub Species of Belarus before the year 2000, had statistically significant ($p < 0,05$) low level of genetic polymorphism as compared to the old-age and modern selected varieties, included in the National Registry of Belarus after the year 2000.

Key words: *Linum usitatissimum* L., genetic polymorphism, SSR-analysis, PIC, bootstrap sampling.

УДК: 574.3:575.24/.25:616.151.5

Гончар, А.Л. Роль генетических факторов в развитии инфаркта миокарда (гендерные и возрастные аспекты) / А.Л. Гончар, И.Б. Моссэ // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15 – Минск, 2013. – С. 87–95.

Исследованы гендерные и возрастные аспекты генетической предрасположенности к развитию инфаркта миокарда (ИМ). Проведено сравнение частот наиболее часто встречаемых комбинаций генотипов риска инфаркта миокарда у пациентов обоих полов и проанализированы особенности распределения комбинаций генотипов риска ИМ. Показано, что у женщин риск развития ИМ в большей степени обусловлен проявлением именно наследственных факторов, в то время как у мужчин существенный вклад вносят средовые факторы. Выявлено, что наследственная предрасположенность к ИМ чаще реализуется в более раннем возрасте, причем, чем больше у человека факторов риска ИМ, тем раньше реализуется эта предрасположенность.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, полиморфный вариант гена, наследственная предрасположенность, гендерные и возрастные аспекты, полиморфизм, мутация.

Gonchar, A. Role of genetic risk factors in myocardial infarction development (sex and age aspects) / A. Gonchar, I. Mosse // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 87–95.

Sex and age aspects of myocardial infarction (MI) predisposition are investigated. It is shown that the risk of MI in women is more due to genetic factors, while environmental factors influence MI more prevalently in men. It is revealed that genetic factors play highest role in MI arising at a younger age, and environmental factors impact increases with aging.

Key words: myocardial infarction, sex and age aspects, DNA polymorphisms, PCR analysis.

УДК 601.2:579.8

Молекулярное типирование энтомопатогенных бактерий, изолированных на территории Беларуси / Д.П. Бажанов [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 96–103. – Соавт.: К.К. Яцевич, Л.И. Прищепа, Д.В. Войтка.

В результате типирования варибельных участков генома по методу Rep-ПЦР исследуемые энтомопатогенные бактерии разделены на три геномные группы. Филогенетический анализ генов 16S рРНК позволил отнести их к группе видов *B. Thuringiensis – cereus – anthracis*, при этом штаммы групп I и III принадлежали к геномовиду *B. thuringiensis*. Филогенетический анализ генов *hag* установил принадлежность штаммов геномных групп I и III к *B. thuringiensis* serovar *darmsstadiensis*. Бактерии геномной группы II были близки двум сероварам – *B. thuringiensis* serovar *alesti* и *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, в связи с чем могут принадлежать к любому из этих сероваров либо иметь собственный, близкий сероварам *alesti* и *kurstaki*, но ранее не известный серотип.

Ключевые слова: энтомопатогенные бактерии, *Bacillus thuringiensis*, генотипирование, идентификация.

Molecular typing of entomopathogenic bacteria isolated in Belarus / D.P. Bazhanov [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 15. – Minsk, 2013. – P. 96–103. – K. Yatsевич, L. Pryshepa, D. Voytka.

The entomopathogenic bacteria studied were divided into three genomic groups as a result of Rep-PCR typing of the variable genome regions. Results of the based on 16S rRNA genes phylogenetic analysis allowed to affiliate them in the *B. thuringiensis - cereus - anthracis* species group with belonging of the groups I and III strains to genomospecies *B. thuringiensis*. Phylogenetic analysis of *hag* genes revealed belonging of the genomic groups I and III strains to *B. thuringiensis* serovar *darmsstadiensis*. Bacteria of the genomic group II were close *B. thuringiensis* serovar *alesti* and *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*. They may belong to any of them, or to have their own undiscovered serotype.

Key words: entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis*, genetic typing, identification.

УДК 635.21 : 631.527.3 : 631.527.5 : 632.938.1 : 577.21

Полевая устойчивость к фитофторозу гибридов, полученных путем опыления вида-посредника *Solanum verrucosum* и SvSv-линий на его основе диплоидными 1 EBN видами картофеля / Е.В. Воронкова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 15. – Минск, 2013. – С. 104–110. – Соавт.: Ю.В. Полюхович, А.В. Савчук, О.Н. Гукасян, А.П. Ермишин

В результате двухлетней оценки межвидовых гибридов картофеля, полученных при опылении вида-посредника *S. verrucosum* и SvSv-линий на его основе диплоидными 1 EBN видами картофеля *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum*, *S. polyadenium* и *S. commersonii*, показана высокая наследуемость межвидовыми гибридами признака полевой устойчивости к фитофторозу, интрогрессированного от 1 EBN диких видов. Несмотря на более высокую частоту высоко устойчивых генотипов среди межвидовых гибридов на основе *S. verrucosum*, гибриды с SvSv-линиями представляются более перспективными для интрогрессии *R*-генной устойчивости к фитофторозу от диплоидных 1 EBN видов в селекционный материал. При относительно большой доле (более трети популяции) устойчивых и высоко устойчивых генотипов, гибриды на основе SvSv-линий несут большее количество признаков культурного картофеля, в частности, способность к стабильному клубнеобразованию. Среди гибридов на основе SvSv-линий выделены образцы со стабильно высокой и стабильно низкой устойчивостью к фитофторозу, которые могут быть использованы в качестве родительских форм при создании расщепляющихся гибридных популяций, предназначенных для маркирования и картирования новых *Rpi*-генов, интрогрессированных в селекционный материал от диплоидных 1 EBN видов картофеля.

Ключевые слова: *S. verrucosum*, SvSv-линии, диплоидные 1 EBN виды картофеля, межвидовые гибриды, *Rpi*-гены, полевая устойчивость к фитофторозу.

Field late blight resistance of hybrids resulted from pollination of bridge species *Solanum verrucosum* and SvSv-lines on its basis by diploid 1 EBN potato species / E.V. Voronkova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 104–110. – Yu. Polyukhovich, A. Savchuk, O. Gukasyan, A. Yermishin.

High heritability of field late blight resistance introgressed from 1 EBN species was demonstrated as the result of two year trials of hybrids resulted from the pollination of bridge species *S. verrucosum* and SvSv-lines on its basis by diploid 1 EBN potato species *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum*, *S. polyadenium* и *S. commersonii*. In spite of higher frequency of highly resistant genotypes among interspecific hybrids on the basis of *S. verrucosum*, hybrids with SvSv-lines looked to be more promising for introgression of *R*-gene late blight resistance from 1 EBN species into breeding material. SvSv-lines and their hybrids carried more characters of cultivated potato, in particular stable tuber formation ability, having rather large part (more than one third) of resistant and highly resistant interspecific hybrids. The genotypes with stable high and stable low late blight resistance have been revealed among hybrids with SvSv-lines. These hybrids will be used as parents for production of segregating hybrid populations assigned for marking and mapping of novel *Rpi*-genes, introgressed from 1 EBN species into breeding material.

Key words: *S. verrucosum*, SvSv-lines, diploid 1 EBN potato species, interspecific hybrids, *Rpi*-genes, field late blight resistance.

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. Рекомендуемый средний объем аннотации – 500 знаков с пробелами. 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 (210×297 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. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.

6. 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).

7. 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.

8. 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.

9. Кавычки по всему тексту должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбивают от заключенных в них слов.

10. 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.

11. 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.

12. 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 15

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 15.09.2013. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 13,95. Уч.изд. л. 8,81. Тираж 100 экз. Заказ № 2482
Оригинал-макет подготовлен ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»