

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 16**

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. 16. – 130 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>Н.В. Никитченко, Е.В. Сечко, В.В. Хомич, А.М. Чичко, Р.И. Гончарова, А.В. Сукало, Н.И. Рябоконт</i> Повреждения ДНК и их репарация при ювенильном ревматоидном артрите и в контрольных группах детей.....	7
<i>С.С. Ниязова, Н.Н. Чакова, Е.П. Михаленко, Э.В. Крупнова, Н.В. Чеботарева, С.М. Комиссарова</i> Влияние полиморфизма генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы на выраженность клинических признаков гипертрофической кардиомиопатии.....	16
<i>М.Д. Амелянович, П.М. Морозик, А.Л. Гончар, И.Б. Моссэ</i> Генетические факторы риска развития метаболического синдрома.....	24
<i>К.В. Жур, Л.А. Кундас, Н.И. Бышнев, Е.А. Лосицкий, П.Н. Малашевич, И.Б. Моссэ</i> Молекулярно-генетический анализ гена <i>HIF1A</i> для оценки физической работоспособности спортсмена.....	32
<i>В.С. Панкратов, О.Г. Давыденко</i> Структура генофондов населения двух регионов Белорусского Полесья по маркерам Y-хромосомы и митохондриальной ДНК	39
<i>С.И. Вакула, В.Н. Леонтьев, В.Г. Лугин, В.В. Титок, А.В. Кильчевский</i> Обоснование оптимальных параметров модели сорта льна масличного для условий Республики Беларусь.....	48
<i>О.Ю. Урбанович, П.В. Кузмицкая</i> ПЦР-основанное клонирование гомолога генов <i>HcrVf</i> из генома сорта груши Память Яковлева	55
<i>А.М. Свирцевская, О.М. Малышева, Л.В. Милько, О.Ч. Мазур, С.А. Мелентьева, И.С. Татур, А.В. Кильчевский</i> Анализ вариантов митохондриальных генов <i>atpA</i> и <i>atpB</i> у линий и гибридов сахарной свеклы (<i>Beta vulgaris</i> L.), возделываемых в Беларуси.....	61
<i>Е.А. Волуевич</i> Генетические подходы в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине ...	72
<i>Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич, А.Ю. Носова</i> Создание и оценка вторичного генофонда тритикале (х <i>Triticosecale</i> Wittm.) для использования в селекции на короткостебельность и устойчивость к предуборочному прорастанию ...	82
<i>С.В. Кубрак, Н.Б. Павловский, Л.В. Кухарева, В.В. Титок, Л.В. Хотылева</i> Оценка генетической гетерогенности растений <i>Calluna vulgaris</i> и <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (семейства <i>Ericaceae</i>), перспективных для создания декоративных посадок	91

А.П. Ермишин

Особенности использования метода ПЦР в реальном времени для детекции и количественного определения генетически модифицированных составляющих в продуктах питания..... 97

О.Г. Бабак, Н.А. Некрашевич, А.М. Добродькин, И.Г. Пугачева, М.М. Добродькин,

А.В. Кильчевский

Использование ДНК-маркеров для изучения генетической изменчивости родительских форм гибридов томата (*Solanum lycopersicum*) и особенностей проявления гетерозиса..... 104

К.К. Яцевич, Д.П. Бажанов

Конструирование *in vitro* рекомбинантных штаммов-деструкторов симазина 113

Рефераты..... 121

Правила оформления статьи..... 129

CONTENTS

<i>N. Nikitchehko, E. Sechko, V. Chomich, A. Chichko, R. Goncharova, A. Sukalo, N. Ryabokon</i> DNA damages and their repair at juvenile rheumatoid arthritis and in control groups of children ...	7
<i>S. Niyazova, N. Chakova, E. Michalenko, E. Krupnova, N. Chebotareva, S. Komissarova</i> Impact of genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system on the expression of clinical signs of hypertrophic cardiomyopathy	16
<i>M. Ameliyanovich, P. Marozik, A. Gonchar, I. Mosse</i> Genetic risk factors for developing metabolic syndrome	24
<i>K. Zhur, L. Kundas, N. Byshnev, Y. Lasitski, P. Malashevich, I. Mosse</i> Molecular genetic analysis of <i>HIF1A</i> gene to test athlete performance	32
<i>V. Pankratov, O. Davydenko</i> Gene pools structure of the population of two regions of Byelorussian Polesie based on <i>Y</i> -chromosome and mitochondrial DNA markers	39
<i>S. Vakula, V. Leontiev, V. Luhin, V. Titok, A. Kilcheuski</i> Objectivation for optimal model parameters of flaxseed cultivar for conditions of Belarus	48
<i>O. Urbanovich, P. Kuzmitskaya</i> PCR-based full-length cloning of <i>HcrVf</i> homolog from pear cv. 'Pamyat Yakovleva'	55
<i>A. Svirshchevskaya, O. Malysheva, L. Milko, O. Mazur, S. Melentieva, I. Tatur, A. Kilcheuski</i> Analysis of mitochondrial genes <i>atpA</i> and <i>atp6</i> variants in sugar beet (<i>Beta vulgaris</i> L.) lines and hybrids grown in Belarus	61
<i>E. Voluevich</i> Genetic approaches in common wheat breeding for resistance to stem rust	72
<i>N. Dubovets, Y. Sycheva, L. Solovey, T. Shtyk, Y. Bondarevich, A. Nosova</i> Development and assessment of secondary gene pool of triticale (x <i>Triticosecale</i> Wittm.) for use in breeding for semidwarfness and resistance to pre-harvest sprouting	82
<i>S. Kubrak, N. Pavlovsky, L. Kukhareva, V. Titok, L. Khotyleva</i> Genetic heterogeneity of plants promising for landscape gardening – <i>Calluna vulgaris</i> and <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (family <i>Ericaceae</i>)	91
<i>A. Yermishin</i> Peculiarities of using real time PCR method for detection and quantification of genetically modified components in food	97

O. Babak, N. Nekrashevich, A. Dobrodkin, I. Pugachova, M. Dobrodkin, A. Kilcheuski
Use of DNA markers for studying genetic variability of parental forms in tomato hybrids
(*Solanum lycopersicum*) and heterosis manifestation features..... 104

K. Yatsevich, D. Bazhanov
Designing *in vitro* of recombinant strains-destructors by simazine 113

Summaries 121

Instructions to authors 129

Н.В. Никитченко¹, Е.В. Сечко², В.В. Хомич², А.М. Чичко³, Р.И. Гончарова¹, А.В. Сукало³, Н.И. Рябоконт¹

ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК И ИХ РЕПАРАЦИЯ ПРИ ЮВЕНИЛЬНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И В КОНТРОЛЬНЫХ ГРУППАХ ДЕТЕЙ

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

²УЗ «2-я городская детская клиническая больница»
Республика Беларусь, 220020, г. Минск, ул. Нарочанская, 17

³УО «Белорусский государственный медицинский университет», 1-я кафедра детских болезней
Республика Беларусь, 220020, г. Минск, ул. Нарочанская, 17

Введение

Ревматоидные заболевания являются широко распространенными, в том числе среди детского населения. Ювенильный (юношеский) ревматоидный артрит (ЮРА) занимает доминирующие позиции в количественном выражении среди детских аутоиммунных заболеваний и встречается со средней частотой 1–4 случая на 1000 детей [1, 2]. ЮРА характеризуется воспалительными и аутоиммунными реакциями с тяжелыми последствиями, приводящими к частичной или полной потере трудоспособности и даже летальному исходу.

Имеется большое количество данных о повышенных уровнях повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови взрослых пациентов с ревматоидным артритом. В частности, установлена высокая частота окислительных повреждений ДНК [3, 4], однонитевых и двунитевых разрывов ДНК [5] как в клетках синовиальной жидкости [4], так и в лимфоцитах периферической крови [3, 5]. В большинстве работ предполагается, что регистрируемые повреждения ДНК индуцированы активными формами кислорода и азота (АФК или ROS – reactive oxygen species), вызывающими окислительный стресс клеток в результате заболевания. Тем самым повреждениям ДНК отводится вторичная роль по отношению к заболеванию, т.е. *повреждения ДНК являются следствием ревматоидных заболеваний*. Высказывается также мнение о том, что повреждения ДНК могут участвовать в патогенезе ревматоидных заболеваний, в результате которых наблюдается возникновение или усиление воспалительных процессов с выделением АФК. Таким образом, предполагается, что *повреждения ДНК являются первичными факторами (триггерами) ревматоидных*

заболеваний. Аналогичная ситуация сложилась и с антиоксидантной системой: имеется огромный массив данных, свидетельствующих о нарушениях антиоксидантной системы при ревматоидных заболеваниях, и предполагается, что эти нарушения могут быть как следствием [6], так и триггером иммуновоспалительных процессов при ревматоидных заболеваниях [7]. Существует гипотеза, объединяющая эти два предположения о первичности и вторичности повреждений ДНК в патогенезе ревматоидных заболеваний [8], что подчеркивает научную значимость исследований в этой области.

Что касается детской когорты с диагнозом ЮРА, то имеются лишь единичные данные о повышенных уровнях повреждений ДНК в лимфоцитах этой группы пациентов. Так, в работе E. Demirkaaya с соавторами [9] изучена небольшая выборка из 20 пациентов с ЮРА (полиартрит и ЮРА с системным началом) и 16 контрольных- доноров. Помимо повышенных спонтанных уровней повреждений ДНК авторами этой работы показана более высокая чувствительность лимфоцитов пациентов к индукции повреждений ДНК и замедленная их репарация по сравнению с контролем. Замедленная репарация ДНК зарегистрирована также в работе [10] при изучении лимфоцитов крови пациентов с диагнозом ЮРА и с другими ревматоидными заболеваниями – системной красной волчанкой и системным склерозом. Дефекты репарации двунитевых разрывов ДНК обнаружены у пациентов с системной красной волчанкой при облучении лимфоцитов периферической крови *in vitro* и их анализе на 5-м часу репарации с использованием ряда (9-ти) тестов, включая нейтральную версию метода ДНК-комет [11].

Таким образом, весьма ограниченное количество работ о повреждениях ДНК и проблемах их репарации у пациентов с ЮРА свидетельствует о необходимости расширения исследований в данном направлении с фундаментальными и прикладными целями.

Основной целью представленной работы было изучить уровни повреждений ДНК и их репарацию в лимфоцитах периферической крови пациентов с диагнозом ЮРА и в контрольных

группах детей, проживающих на территории Беларуси. В задачи работы входили:

- 1) оценка уровня спонтанных повреждений ДНК;
- 2) анализ индуцированных повреждений ДНК (или чувствительность ДНК к дополнительному окислительному стрессу);
- 3) изучение кинетики, скорости и эффективности репарации индуцированных повреждений ДНК.

Материалы и методы

Формирование исследуемых групп проведено на базе УЗ «2-я городская детская клиническая больница». От родителей каждого участника исследований получено информированное согласие и заполненная анкета, формы которых утверждены Этическим комитетом УО «2-я городская клиническая больница». Общее количество доноров в сформированных группах составило 179 человек.

В группы исследований включены доноры обоих полов детской возрастной категории (от 1 года до 17 лет). При формировании групп исключалось любое сопутствующее заболевание, особенно сопряженное с воспалительными и аутоиммунными реакциями. Велся контроль возможного мутагенного воздействия (флюорографическое или рентгенологическое обследование, курение, алкоголь и др.).

Основную группу исследования составили пациенты с диагнозом ЮРА, включая различные подтипы данного заболевания (юношеский олигоартрит и полиартрит, а также юношеский артрит с системным началом).

Для исключения влияния базисной терапии на ДНК и ее репарацию из основной группы с ЮРА отдельно была выделена подгруппа пациентов с базисной терапией препаратами цитостатического и иммунодепрессивного действия (метотрексат и циклоспорин).

Доноры без базисного лечения также были выделены в отдельную подгруппу. Ее составили пациенты, не получавшие ранее медикаментозного лечения по поводу ЮРА, или получавшие лечение нестероидными противовоспалительными средствами (НПВС) в сочетании (или без) с глюкокортикостероидами и слабыми антибиотиками, а также пациенты после длительного периода (от 6 месяцев до 3 лет), прошедшего после базисного лечения.

Для негативного (популяционного) контроля выбраны пациенты с заболеваниями, не имеющими аутоиммунного характера и не сопровождающиеся воспалительными процессами. Основную часть этой группы составили пациенты с вегетативной дисфункцией, в значительно меньшем количестве - с варикоцеле и соматическими заболеваниями сердца (пролапс митрального клапана, миокардиодистрофия, врожденный порок сердца и др.) и единичные случаи - с другими диагнозами (гастрит, киста яичка).

Позитивный контроль для ЮРА составили пациенты с диагнозом реактивный артрит (различной локализации) и без других сопряженных заболеваний. Данное заболевание характеризуется воспалительными процессами в суставах и не сопровождается аутоиммунными реакциями, что является его отличительным от ЮРА признаком. Пациенты с реактивным артритом не получали лечение или для лечения использовались НПВС и/или слабые антибиотики.

Отбор проб венозной крови проводился утром строго натощак в стерильные пробирки с гепарином. Доставка проб в лабораторию генетической безопасности ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» осуществлялась в течение последующих 2 часов. Для изоляции лимфоцитов из крови использовалась стандартная методика градиента плотностей, поддерживаемого с помощью гистобака-1077 (Histopaque-1077 производства Sigma-Aldrich).

Контроль жизнеспособности клеток проведен методом *in situ* анализа с использованием смеси (1:1) двух флуоресцентных красителей акридинового оранжевого и бромистого этидия в концентрациях 100 мкг/мл и эпифлуоресцент-

ного микроскопа Olympus BX51 с фильтром U-MWIB3 (длина волны возбуждения 470–495 nm, длина волны свечения 510 nm) и увеличением $\times 400$ [12]. Данный метод позволяет получить дифференциальную окраску и проводить идентификацию живых, некротических и апоптотических клеток. У всех доноров, взятых в исследование, количество нежизнеспособных (некротических и апоптотических) клеток не превышало нормальные уровни ($<4\%$), характерные для лимфоцитов периферической крови.

Для оценки уровней спонтанных и индуцированных повреждений ДНК применен с некоторыми модификациями стандартный протокол щелочной версии метода ДНК-комет, описанный N.P. Singh с соавторами [13]. Для изучения ответа лимфоцитов доноров на мутагенное воздействие (оценка чувствительности, скорости и эффективности репарации ДНК) выбран модельный мутаген пероксид водорода, являющийся одним из основных индукторов окислительного стресса в живых клетках и в организме в целом [14]. Использовались условия обработки пероксидом водорода, широко апробированные нами ранее на различных клетках крови человека *in vitro*, включая лимфоциты взрослых доноров [15–17]. А именно, концентрация пероксида 100 мкМ, продолжительность обработки клеток *in vitro* 1 мин при 4 °С, отмывка от пероксида в течение последующих 5 мин при 4 °С, включая 3 мин осаждения клеток в микроцентрифуге с охлаждением. Инкубация клеток для восстановления после обработки пероксидом проводилась в микропробирках в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS в течение 180 мин при 37 °С. Для изучения кинетики и скорости репарации повреждений ДНК выбраны следующие временные интервалы: 0, 15, 30, 60, 120 и 180 мин после обработки мутагеном [15–17]. Анализ клеток на наличие

повреждений ДНК выполнен с использованием бромистого этидия в концентрации 2 мкг/мл и эпифлуоресцентного микроскопа Olympus BX51 с фильтром U-MWG2 (длина волны возбуждения 510–550 nm, длина волны свечения 590 nm) и 400-кратным увеличением. Для подсчета относительного количества повреждений ДНК (в условных единицах – усл.ед.) применен широко распространенный подход, предложенный A.R. Collins et al. [18, 19]. Оценка эффективности репарации индуцированных повреждений ДНК проведена с использованием следующей формулы, учитывающей репарацию спонтанных повреждений ДНК, протекающую параллельно с репарацией повреждений, индуцированных пероксидом водорода:

$$RF = \frac{((ID_0 - CD_0) - (ID_{180} - CD_{180})) \times 100}{(ID_0 - CD_0)},$$

где RF – reduction factor; эффективность репарации, выраженная в процентах;
 ID_0 и ID_{180} – induced damages; индуцированный уровень повреждений ДНК, регистрируемый соответственно на 0 и на 180 мин репарации;
 CD_0 и CD_{180} – control damages; спонтанный (фоновый) уровень повреждений ДНК, регистрируемый соответственно на 0 и на 180 мин репарации.

Статистический анализ данных проведен в пакете прикладных программ Statistics. Для каждой группы исследований рассчитаны средние значения и стандартные отклонения. Сравнительный анализ групп исследования проведен с использованием t критерия Стьюдента. Проведены также корреляционный, регрессионный и дисперсионный анализы данных. Для регрессионного анализа использованы стандартные и заданные пользователем функции.

Результаты и обсуждение

Полученные нами данные по контрольной группе (популяционный, негативный контроль, табл. 1) свидетельствуют о том, что спонтанные уровни повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови детей, проживающих на территории Беларуси, находятся на низком уровне (в среднем ниже 1 усл.ед. при индивидуальной вариации в пределах 10-го и 90-го перцентиля от 0 до 2 усл.ед). Зарегистрированные нами

уровни являются более низкими, чем показано для украинской популяции детей (средний уровень $9,0 \pm 5,7$ усл.ед.) [20] с использованием того же стандартного протокола N.P. Singh et al. [13]. Такое расхождение в данных, возможно, связано с тем, что контрольная группа детей из украинской популяции проживала на территориях с повышенным уровнем радиоактивного загрязнения вследствие Чернобыльской

аварии, где почвенное загрязнение составляло около 13–98 кБк/м² ¹³⁷Cs [20], что оказывается в 3 и более раз выше доаварийной нормы даже на момент проведения исследований в 2003 г., т.е. спустя 17 лет после аварии. Исследуемые нами дети, включая контрольную группу, в подавляющем большинстве являются жителями Минска или Минской области, т.е. проживают на относительно чистой территории.

Уровни спонтанных повреждений ДНК, зарегистрированные нами в контрольной группе детского населения Беларуси, являются также более низкими по сравнению с контрольными взрослыми донорами из той же популяции. Так, ранее было показано, что средние спонтанные уровни повреждений ДНК в лимфоцитах контрольных групп доноров взрослой

возрастной категории, проживающих на территории Беларуси, составляют 7,54 и 9,13 усл. ед. [21, 22]. По нашим неопубликованным данным, средний уровень спонтанных повреждений ДНК в контрольной группе взрослых доноров белорусской популяции (средний возраст 39 лет) составляет $3,39 \pm 0,46$ усл. ед., что существенно ($P < 0,001$) в 4 раза выше, чем в контрольной группе детей (табл. 1). На основании этих данных можно предположить, что количество повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови увеличивается с возрастом доноров. Многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) исследуемой группы детей подтвердил тенденцию о возможном влиянии возраста на повреждаемость ДНК ($P = 0,099$ для спонтанных повреждений ДНК).

Таблица 1

Уровни повреждений ДНК и показатели ее репарации в группе популяционного (негативного) контроля

Группы исследования	Количество доноров	Средний возраст, годы	Повреждения ДНК (усл. ед.), среднее \pm SD		Эффективность репарации ДНК (%), среднее \pm SD	Скорость репарации ДНК (мин) ^a , среднее \pm SD
			Спонтанные	Индукцированные H ₂ O ₂		
Контроль негативный (все доноры)	112	14,0	0,76 \pm 0,09	52,79 \pm 2,62	99,92 \pm 0,22	6,68 \pm 0,44
Из них:						
девочки	47	13,9	0,68 \pm 0,13	52,11 \pm 4,00	99,86 \pm 0,18	6,22 \pm 0,47
мальчики	65	14,2	0,82 \pm 0,12	53,28 \pm 2,87	99,96 \pm 0,36	7,02 \pm 0,68
с диагнозом вегетативная дисфункция	86	14,1	0,70 \pm 0,10	51,60 \pm 2,29	100,04 \pm 0,27	6,38 \pm 2,49
варикоцеле	11	15,6	0,86 \pm 0,32	55,91 \pm 6,76	99,82 \pm 0,45	7,42 \pm 1,55
соматические заболевания сердца	12	13,0	1,04 \pm 0,30	53,33 \pm 6,62	99,73 \pm 0,69	8,35 \pm 1,56

^a – время, необходимое для репарации 50% индуцированных повреждений ДНК.

При оценке влияния пола на исследуемые признаки (табл. 1) обнаружена статистически незначимая (тест *t*-Стьюдента) тенденция более высоких уровней повреждений ДНК у мальчиков по сравнению с девочками. Многофакторный дисперсионный анализ не выявил влияния пола ребенка ($P > 0,6$) на уровни спонтанных и индуцированных повреждений ДНК.

Поскольку абсолютно здоровых детей почти нет, то для наших исследований был выбран

негативный контроль к группе ЮРА из пациентов, не имеющих воспалительных и аутоиммунных заболеваний, но с различными диагнозами (табл. 1). Проведенный многофакторный дисперсионный анализ также не обнаружил влияния диагностируемых заболеваний (вегетативная дисфункция, варикоцеле и др.) в выбранной нами группе негативного контроля, на уровни повреждений ДНК (спонтанных и индуцированных) и репарацию ДНК. Эти данные подтверждают на-

ше предположение о корректности включения в контроль и объединения в одну группу детей разного пола и с нарушениями, не сопровождающимися аутоиммунными и воспалительными заболеваниями, характерными для ЮРА.

В рамках представленной работы впервые проведено изучение кинетики репарации ДНК в лимфоцитах детей. Регрессионный анализ репарации повреждений ДНК, индуцированных пероксидом водорода, показал, что экспоненциальная функция, используемая нами ранее по аналогии с работой [23] для описания кинетики репарации ДНК в различных кроветворных линиях клеток человека, а также в лимфоцитах взрослых доноров [15–17], хорошо описывает кинетику репарации в лимфоцитах детей после обработки *in vitro* пероксидом водорода. Функция имеет следующий вид:

$$y = a \times \exp(-t/b) + c,$$

где y – количество индуцированных повреждений ДНК в момент t (повреждения

ДНК после индукции пероксидом водорода и регистрируемые на 0–180 мин репарации);

a – расчетный коэффициент, обозначающий количество индуцированных повреждений ДНК (0 мин репарации);

t – время репарации (0–180 мин);

b – расчетный коэффициент, определяющий скорость репарации;

c – расчетный коэффициент, обозначающий нерепарированные повреждения ДНК, т.е. оставшиеся после индукции пероксидом водорода на 180 мин репарации.

Пример обычного графического изображения кинетики репарации ДНК с использованием заданной функции в пакете прикладных программ “Statistics” представлен на рисунке. Аналогичная картина получена для всех исследуемых доноров, что подтверждает тот факт, что выбранная нами функция адекватно описывает кинетику репарации повреждений ДНК, индуцированных в лимфоцитах периферической крови детей *in vitro*.

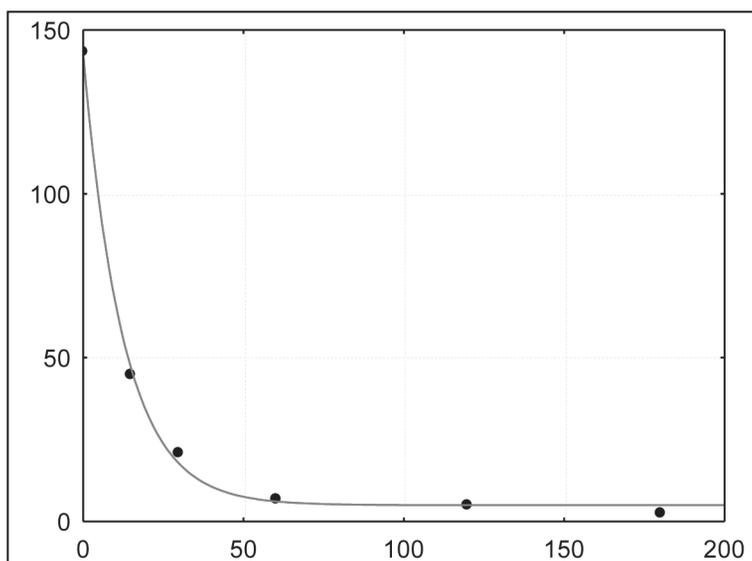


Рис. Типичная кинетика репарации повреждений ДНК, индуцированных 100 мкМ H_2O_2 в лимфоцитах периферической крови детей *in vitro*. Данные по Донору 5.

С использованием данной функции для каждого донора была рассчитана скорость репарации повреждений ДНК как время, необходимое на репарацию первых 50% повреждений, индуцированных пероксидом водорода. Результаты расчетов, представленные в табл. 1, свидетельствуют о высокой скорости репарации ДНК в лимфоцитах де-

тей контрольной группы (в среднем около 7 мин), которые сопровождаются хорошей эффективностью репарации, рассчитанной на 3 ч восстановления клеток после окислительного стресса. В среднем репарируется более 99,9% повреждений ДНК, индуцированных окислительным стрессом в группе негативного контроля (табл. 1).

Пациенты с диагнозом реактивный артрит составили группу позитивного контроля для ЮРА. Эта группа, имеющая воспалительные процессы в суставах, характеризовалась более высокими

уровнями спонтанных и индуцированных повреждений ДНК по сравнению с негативным контролем при сохраняющейся высокой скорости и эффективности репарации ДНК (табл. 2).

Таблица 2

Уровни повреждений ДНК и показатели ее репарации у пациентов с ЮРА по сравнению с контрольными группами детей

Группы исследования	Количество доноров (% жен. пола)	Средний возраст, годы	Повреждения ДНК (усл. ед.), среднее \pm SD		Эффективность репарации ДНК (%), среднее \pm SD	Скорость репарации ДНК (мин) ^a , среднее \pm SD
			Спонтанные	Индукцированные H ₂ O ₂		
Контроль негативный (все доноры)	112 (42%)	14,0	0,76 \pm 0,09	52,79 \pm 2,62	99,92 \pm 0,22	6,68 \pm 0,44
Реактивный артрит (контроль позитивный)	29 (34%)	7,8	1,63 \pm 0,68***	64,43 \pm 5,71*	100,14 \pm 0,21	5,91 \pm 0,50
ЮРА (все пациенты)	38 (71%)	8,1	3,43 \pm 0,35***	76,87 \pm 7,53***	98,47 \pm 1,00*	8,55 \pm 0,83 ^x
Из них:						
ЮРА (без базисной терапии)	19 (79%)	6,7	3,98 \pm 1,62***	75,95 \pm 2,32**	99,43 \pm 1,04	8,08 \pm 0,90 ^x
ЮРА (с базисной терапией)	19 (63%)	9,4	2,95 \pm 0,56***	77,79 \pm 9,04***	97,54 \pm 1,64**	9,01 \pm 2,34 ^x

^a – время, необходимое для репарации 50% индуцированных повреждений ДНК.

* – $P < 0,05$, ** и *** – соответственно $P < 0,01$ и $P < 0,001$ по сравнению с негативным контролем.

^x – $P < 0,05$ по сравнению с реактивным артритом (критерий *t*-Стьюдента).

Однако максимальные уровни повреждений ДНК в нашем исследовании были обнаружены у пациентов с диагнозом ЮРА (табл. 2). Так, средний уровень спонтанных повреждений ДНК в подгруппе ЮРА без базисного лечения был в 5,2 и 2,4 раза выше, чем соответственно в негативном и позитивном контроле. Средний уровень индуцированных повреждений ДНК был соответственно выше в 1,4 и 1,2 раза. У пациентов из этой подгруппы была также зафиксирована более низкая (в среднем на 21% и 37%) по сравнению с контрольными группами скорость репарации ДНК (табл. 2). Следует подчеркнуть, что пациенты с ЮРА в этой подгруппе не получали медикаментозного лечения или только НПВС, глюкокортикостероидами и слабыми антибиотиками, т.е. такие же медикаментозные препараты, как и в группе позитивного контроля. Тем не менее, у пациентов с ЮРА

из этой подгруппы наблюдается тенденция к увеличению средних уровней спонтанных и индуцированных повреждений ДНК и значимое снижение средней скорости репарации по сравнению с позитивным контролем, что может свидетельствовать о том, что регистрируемые эффекты не связаны с применяемой терапией НПВС, глюкокортикостероидами и слабыми антибиотиками.

Существенное влияние возраста на исследуемые показатели у пациентов с ЮРА в сторону отклонения от контрольных значений можно также исключить, т.к. средний возраст в этой группе был ниже, чем в негативном контроле (табл. 2). А при меньшем возрасте, в соответствии с нашими данными по негативному контролю, следовало ожидать не увеличения, а уменьшения уровня повреждений ДНК, а также увеличения скорости репарации.

Сравнительный анализ данных двух подгрупп с диагнозом ЮРА – без базисного лечения и с базисным лечением – показал тенденцию возможного влияния цитостатиков в сторону уменьшения спонтанного уровня повреждений ДНК и снижения скорости и эффективности репарации ДНК (табл. 2). Однако имеющиеся у нас небольшие выборки пациентов с ЮРА не позволили выявить статистически значимые различия между этими подгруппами и тем самым определить эффекты базисного лечения. В тоже время обнаружены общие для этих двух подгрупп тенденции эффекта заболеваемости на исследуемые показатели, а именно увеличение уровней спонтанных и индуцированных повреждений ДНК и уменьшение скорости репарации. Это дает возможность объединять данные по всем пациентам с диагнозом ЮРА (с и без базисного лечения), что усиливает статистическую значимость результатов исследования и расширяет возможность их использования (табл. 2, все пациенты с ЮРА).

Таким образом, полученные нами данные о повышенных уровнях спонтанных повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови и о повышенной чувствительности этих клеток к мутагенному воздействию пероксидом водорода подтвердили результаты, собранные на меньшей выборке пациентов с диагнозом ЮРА в работе Demirkaaya с соавторами [9], упомянутой выше. Помимо этого, нами установлено, что скорость репарации ДНК при ЮРА снижается в среднем на 21% по сравнению с негативным контролем. Сравнительный анализ данных по ЮРА и реактивному артриту дает нам основание полагать, что аутоиммунная природа ЮРА, возможно, в комплексе с воспалительными

процессами ассоциирована с установленным нарушением (снижением скорости) репарации ДНК. Это предположение касается системы эксцизионной репарации оснований ДНК (base excision repair – BER), поскольку повреждения ДНК, индуцированные окислительным стрессом (главным образом, окислительные повреждения оснований и нитевые разрывы ДНК), восстанавливаются с участием BER [24–26].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о неблагоприятном состоянии генома у пациентов с диагнозом ЮРА. Они также могут указывать на нестабильность генома у этой группы населения, если использовать рекомендации, в которых принимаются следующие критерии нестабильности генома:

- (i) повышенные фоновые уровни повреждений ДНК,
- (ii) повышенная чувствительность к мутагенному воздействию,
- (iii) снижение эффективности репарации ДНК [21, 22, 27, 28].

При этом в качестве дополнительного критерия нестабильности генома, по-видимому, можно использовать *пониженную скорость репарации ДНК*, зарегистрированную нами у детей с ЮРА. И если повышенные уровни спонтанных и индуцированных повреждений ДНК связаны с высокой концентрацией АФК в крови у пациентов с ревматоидными заболеваниями и могут элиминироваться при нормальной работе системы репарации, то низкая скорость репарации является показателем дефекта системы эксцизионной репарации оснований ДНК и, таким образом, в наибольшей степени может быть причиной дестабилизации генома.

Заключение

Впервые для детской популяции Беларуси изучены уровни спонтанных и индуцированных повреждений ДНК. Описаны кинетика, эффективность и скорость репарации в лимфоцитах периферической крови доноров детской возрастной категории в норме (негативный контроль) и при патологии (при воспалительных и аутоиммунных реакциях). Установлено, что у пациентов с диагнозом ЮРА наблюдаются повышенные уровни спонтанных и индуцированных повреждений ДНК, а также низкая скорость репарации ДНК.

Представленная работа проведена в рамках задания 2.28 ГПНИ «Фундаментальные

основы биотехнологий», подпрограмма «Геномика» (2011–2015 гг.). Авторы статьи выражают благодарность всем донорам и их родителям за согласие участвовать в исследовании, а также процедурной медсестре отделения кардиологии УЗ «2-я городская детская клиническая больница» Е.А. Денкевич за сбор образцов крови, сотрудникам лаборатории генетической безопасности ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Н.В. Савиной и О.П. Романюк за активное участие в доставке образцов крови в лабораторию для проведения исследований.

Список использованных источников

1. Manners, P.J. Prevalence of juvenile chronic arthritis in a population of 12-year-old children in urban Australia / P.J. Manners, D.A. Diepeveen // *Pediatrics*. – 1996. – Vol. 98. – P. 84–90.
2. 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: initiation and safety monitoring of therapeutic agents for the treatment of arthritis and systemic features / T. Beukelman [et al.] // *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. – 2011. – Vol. 63, № 4. – P. 465–482.
3. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases / S. Bashir [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 1993. – Vol. 52, № 9. – P. 659–666.
4. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis / S. Haizadeh [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2003. – Vol. 5, № 5. – R234–240.
5. Increased DNA strand breaks in mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis / L.L. Bhusate [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 1992. – Vol. 51, № 1. – P. 8–12.
6. Karaman, A. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis / A. Karaman, D.N. Binici, M.A. Melicoğlu // *Mutat. Res.* – 2011. – Vol. 721, № 1. – P. 1–5.
7. The rheumatoid arthritis shared epitope increases cellular susceptibility to oxidative stress by antagonizing an adenosine-mediated anti-oxidative pathway / S. Ling [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2007. – Vol. 9, № 1. – R5.
8. The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks / D. Menendez [et al.] // *Plos Genetics*. – 2012. – Vol. 7, № 3. – e1001360.
9. Genotoxicity of anti-tumor necrosis factor therapy in patients with juvenile idiopathic arthritis / E. Demirkaya [et al.] // *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. – 2010. – Vol. 62, № 1. – P. 73–77.
10. Delayed repair of DNA damage by ionizing radiation in cells from patients with juvenile systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis / D. McCurdy [et al.] // *Radiat. Res.* – 1997. – Vol. 147, № 1. – P. 48–54.
11. Defective DNA double-strand break repair in pediatric systemic lupus erythematosus / R.C. Davies [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2012. – Vol. 64, № 2. – P. 568–578.
12. Techniques in apoptosis: a user's guide / A.T. Gotter, S.J. Martin (eds). – London: Portland Press Ltd., 1996. – 333 p.
13. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells / N.P. Singh [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 1998. – Vol. 175. – P. 184–191.
14. Shackelford, R.E. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function / R.E. Shackelford, W.K. Kaufmann, R.S. Paules // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28, № 9. – P. 1387–1404.
15. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulate DNA repair in human cells *in vitro* / N.I. Ryabokon [et al.] // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 587. – P. 52–58.
16. Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining / N.I. Ryabokon [et al.] // *Mutat. Res.* – 2008. – Vol. 637, № 1–2. – P. 173–181.
17. Рябоконт, Н.И. Репарация окислительных повреждений ДНК в лимфоцитах человека *in vitro* с использованием одного из перспективных производных 1,4-дигидропиридина / Н.И. Рябоконт, Н.В. Никитченко, Р.И. Гончарова // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. трудов. – Минск, 2009. – Т. 10. – С. 101–107.
18. Collins, A. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA / A. Collins, A. Duthie, V. Dobson // *Carcinogenesis*. – 1993. – Vol. 14. – P. 1733–1735.
19. Collins, A. *In vitro* repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleotide DNA by human cell extract / A. Collins, I. Fleming, C. Gedik // *Biochem. Biophys. Acta*. – 1994. – Vol. 1219. – P. 724–727.
20. Garcia, O. DNA damage evaluated by the comet assay in lymphocyte of children with ¹³⁷Cs internal contamination caused by the Chernobyl accident / O. Garcia, T. Mandina // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 565. – P. 191–197.
21. Chromosomal instability at the 7q11.23 region impacts on DNA damage response in lymphocytes from Williams-Beuren syndrome patients / N.V. Savina [et al.] // *Mutat. Res.* – 2011. – Vol. 724. – P. 46–51.
22. Biomarkers of genome instability in some genetic disorders: a pilot study / N.V. Savina [et al.] // *Biomarkers*. – 2012. – Vol. 17, № 3. – P. 201–208.

23. Radiation-induced DNA damage and its repair in lymphocytes of patients with head and neck cancer and healthy donors / O. Palyvoda [et al.] // *Anticancer Res.* – 2002. – Vol. 22. – P. 1721–1726.

24. Slupphaug, G. The interacting pathway for prevention and repair of oxidative DNA damage / G. Slupphaug, B. Kavli, H.E. Krokan // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 531. – P. 231–251.

25. Dizdaroglu, M. Base excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases / M. Dizdaroglu // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 591. – P. 45–59.

26. Oxidative DNA damage repair in mamma-

lian cells: A new perspective / T.K. Harza [et al.] // *DNA Repair.* – 2007. – Vol. 6. – P. 470–480.

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

28. Оценка статуса генома методами цитогенетического анализа и ДНК-комет у пациентов с множественными врожденными пороками развития / Н.В. Савина [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. трудов.* – Минск, 2009. – Т. 9. – С. 127–133.

Дата поступления статьи 15 августа 2013 г.

С.С. Ниязова¹, Н.Н. Чакова¹, Е.П. Михаленко¹, Э.В. Крупнова¹, Н.В. Чеботарева¹, С.М. Комиссарова²

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИН-АЛЬДОСТЕРОНОВОЙ СИСТЕМЫ НА ВЫРАЖЕННОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

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

²ГУ «Республиканский научно-практический центр «Кардиология»,

Республика Беларусь, 220036, г. Минск, ул. Р. Люксембург, 110

Введение

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – тяжелое первичное заболевание миокарда, характеризующееся локальной гипертрофией миокарда желудочка, развитием нарушений ритма и высоким риском внезапной смерти. Частота встречаемости данной патологии среди населения колеблется от 0,05 до 0,2% в разных популяциях [1]. Наиболее частой причиной развития заболевания являются мутации в генах, кодирующих синтез сократительных белков миокарда. При этом у пациентов с одинаковыми мутациями наблюдаются существенные различия в клинических проявлениях заболевания. Этот феномен объясняют влиянием генов-модификаторов, которые не являются причиной развития данной патологии, но оказывают влияние на степень выраженности клинических признаков ГКМП, в первую очередь, на выраженность гипертрофии левого желудочка. К таким генам-модификаторам относят гены, кодирующие бел-

ки ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) [2]. Хорошо известно, что РААС занимает одно из центральных мест в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы. Показано, что гиперпродукция ангиотензина II, который действует как неспецифический фактор роста, усиливает митогенный эффект в сердечной мышце и сосудах, что способствует разрастанию соединительной ткани в миокарде, пролиферации фибробластов и избыточному синтезу коллагена [3]. Одной из причин повышенного уровня ангиотензина II может быть аллельный полиморфизм различных генов РААС, в том числе кодирующих ангиотензин-превращающий фермент (*ACE*), химазу (*СМА1*), рецептор ангиотензина II типа I (*AGTR1*) и альдостерон-синтазу (*СYP11B2*) [4].

Цель настоящего исследования – изучить влияние генетического полиморфизма белков системы РААС на выраженность клинических признаков ГКМП.

Материалы и методы

В исследование включили 249 пациентов с ГКМП (164 мужчины и 85 женщин, средний возраст $47,5 \pm 13,4$ лет), проходивших обследование и лечение в РНПЦ «Кардиология». На базе РНПЦ «Кардиология» оценивали клиническую картину заболевания, определяли эхокардиографические параметры, характеризующие размеры миокарда левого желудочка (толщину миокарда межжелудочковой перегородки (ТМЖП) и задней стенки левого желудочка (ТЗС ЛЖ), массу миокарда левого желудочка (ММ ЛЖ), индекс массы миокарда (ИММ), наличие обструкции выносящего тракта ЛЖ (ВТЛЖ)), а также анализировали показатели суточного мониторинга

ЭКГ (средний скорректированный интервал (QTc), дисперсия скорректированного интервала (QTcd)), оценивали показатели, характеризующие ишемию миокарда (количество эпизодов ишемии (эпизоды ST), суммарную длительность ишемии в течение суток (продолжительность ST), глубину депрессии сегмента ST)).

У всех пациентов проводили анализ полиморфизмов генов РААС. Выделение тотальной ДНК из цельной крови выполняли методом Mathew [5]. *1166A>C* полиморфизм гена *AGTR1*, *-344C>T* полиморфизм гена *СYP11B2* и *-1903A>G* полиморфизм *СМА1* выявляли с использованием метода полимеразной цепной реакции с изучением полиморфизма длин ре-

стрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ анализ). *I/D*-полиморфизм гена *ACE* определяли с использованием метода ПЦР, в ходе которой возможен синтез двух фрагментов, разница между которыми составляет 287 п.о., что соответствует размеру инсерции. Последовательности использованных в работе праймеров

[6–9] и эндонуклеазы представлены в табл. 1. Праймеры синтезировались ОДО «Праймтех», г. Минск. ПЦР проводили на амплификаторе *MyCycler™ Thermal cycler (BIORAD)*.

Продукты рестрикции фракционировали в агарозном геле с бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете (см. рис.).

Таблица 1

Последовательность праймеров и характеристика аллелей анализируемых полиморфизмов

Ген	Последовательность праймеров	Размер продукта	Эндонуклеаза	Длина фрагментов, п.н.
<i>ACE</i>	F: 5'ctggagaccactcccacatctttct3' R: 5'gatgtggccatcacattcgtcagat3'	487 п.н. 200 п.н.	–	Аллель <i>I</i> – 487 Аллель <i>D</i> – 200
<i>CMA1</i>	F: 5'ggaatgtgagcagatagtcagtc3' R: 5'aatccggagctggagaactcttgc3'	285 п.н.	<i>BstXI</i>	Аллель <i>A</i> – 285 Аллель <i>G</i> – 190, 95
<i>AGTR1</i>	F: 5'tcccccaaaagccaaatcccac3' R: 5'caggctaggagattgcatttctgcag3'	428 п.н.	<i>DdeI</i>	Аллель <i>A</i> – 364, 64 Аллель <i>G</i> – 221, 143, 64
<i>CYP11B2</i>	F: 5'caggaggagaccccatgtgac3' R: 5'cctccaccctgttcagccc3'	538 п.н.	<i>HaeIII</i>	Аллель <i>T</i> – 273, 137, 79, 47 Аллель <i>C</i> – 202, 137, 79, 72, 47

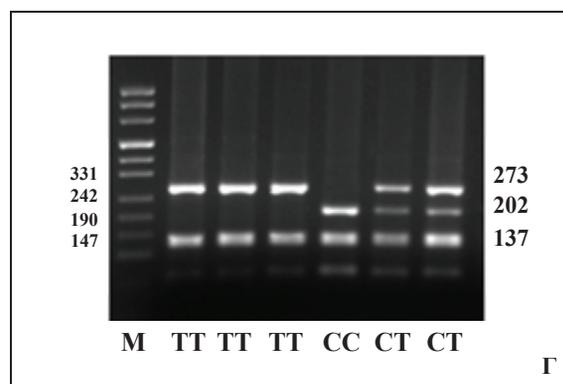
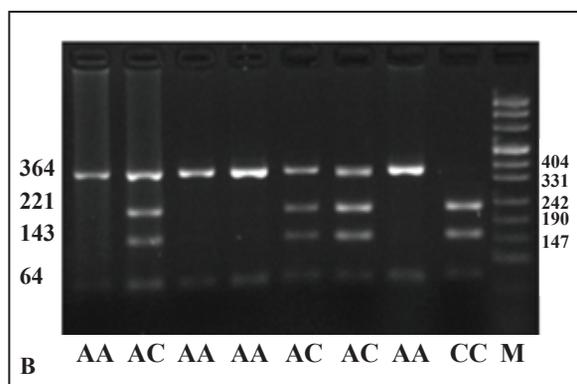
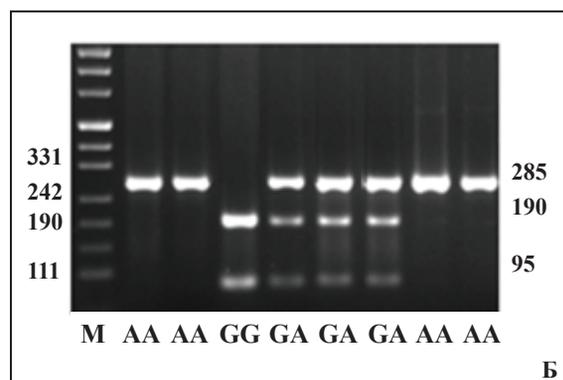
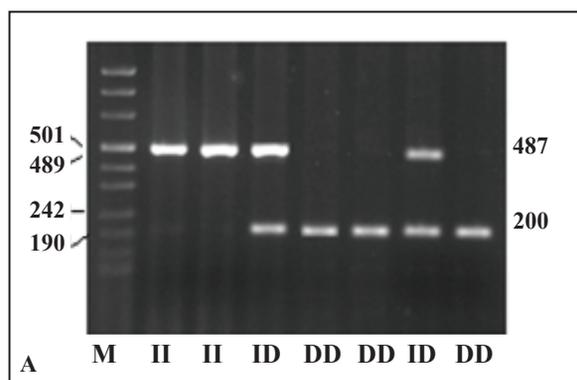


Рис. Электрофореграмма фрагментов после: а – амплификации полиморфных аллелей гена *ACE*; б – рестрикции гена *CMA1*; в – рестрикции гена *AGTR1*; г – рестрикции гена *CYP11B2*

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного пакета "Statistica for Windows 6.0". Сравнение несвязанных между собой групп по количественным признакам осуществлялось непараметрическим методом с использованием *U*-критерия Манна-Уитни. Данные в табли-

цах представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$), а также в виде медианы и значений 25-го и 75-го перцентилей (интерквартильный размах) ($Me [25\%;75\%]$), если распределение отличалось от нормального. Статистически значимыми считали различия при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Мутации в генах, кодирующих белки саркомера, действие которых может усугубляться полиморфизмом генов-модификаторов, влекут за собой рост массы миокарда и развитие выраженной гипертрофии, которая является патоморфологическим признаком ГКМП. При ГКМП происходит утолщение преимущественно левого желудочка и межжелудочковой перегородки. Наиболее значимым методом диагностики ГКМП является эхокардиографическое исследование сердца, позволяющее

оценить степень выраженности гипертрофии левого желудочка, наличие увеличенного градиента давления в выносящем тракте и выявить асимметричную гипертрофию стенок левого желудочка и межжелудочковой перегородки [1, 10].

Проведен анализ влияния полиморфизмов генов *ACE*, *СМА1*, *AGTR1* и *СУР11В2* на степень выраженности основных эхокардиографических показателей у пациентов с ГКМП (табл. 2).

Таблица 2

Средние эхокардиографические структурно-функциональные показатели миокарда у пациентов с ГКМП с различными генотипами

Генотипы	Показатели ($M \pm SD$; $Me [25\%;75\%]$)				
	ИММ, г/м ²	ММ ЛЖ, г	ТМЖП, мм	ТЗС ЛЖ, мм	ГДВТЛЖ, мм рт.ст.
<i>ACE</i>					
<i>II</i> , $n = 52$	190,3 ± 56,7	375,3 ± 121,5	20,3 ± 4,5	12,0 ± 2,5	17,5 [8; 47]
<i>ID</i> , $n = 119$	175,6 ± 57,5	344,4 ± 116,7	19,1 ± 3,6	13,3 ± 3,0¹	20 [8; 54]
<i>DD</i> , $n = 75$	182,2 ± 59,6	360,8 ± 132,7	19,8 ± 3,6	12,9 ± 2,6	18 [6,5; 31,5]
<i>СМА1</i>					
<i>AA</i> , $n = 127$	188,0 ± 51,6	383,2 ± 112,6	19,1 ± 3,6	13,6 ± 2,5	19,5 [6; 44,5]
<i>GA</i> , $n = 107$	179,3 ± 63,8	346,7 ± 129,2²	19,6 ± 3,8	12,8 ± 3,0²	20 [8; 52]
<i>GG</i> , $n = 52$	175,6 ± 52,7	341,8 ± 114,8³	20,2 ± 4,1	12,3 ± 2,8³	17,5 [9; 60]
<i>AGTR1</i>					
<i>AA</i> , $n = 127$	186,1 ± 56,9	372,6 ± 122,3	19,7 ± 3,7	13,1 ± 2,4	20 [8; 56]
<i>AC</i> , $n = 107$	175,5 ± 58,5	337,4 ± 118,2⁴	19,7 ± 4,0	12,7 ± 3,3	17 [9; 48]
<i>CC</i> , $n = 15$	173,8 ± 70,4	335,5 ± 141,6	18,5 ± 4,1	12,7 ± 2,5	27 [6; 49]
<i>СУР11В2</i>					
<i>CC</i> , $n = 65$	170,6 ± 50,6	334,6 ± 112,7	18,9 ± 3,9	12,9 ± 3,1	14 [7; 57]
<i>CT</i> , $n = 118$	186,8 ± 57,6	367,5 ± 120,8	20,0 ± 3,8	12,8 ± 2,8	22,5 [9; 54,5]
<i>TT</i> , $n = 64$	181,2 ± 67,2	356,6 ± 135,8	19,6 ± 3,8	13,1 ± 2,5	19 [8; 44]

Примечание: цифрами обозначены значимые различия, $P < 0,05$: 1 – между группами с генотипами *II* и *ID* (*ACE*); 2 – между группами с генотипами *AA* и *GA* (*СМА1*); 3 – между группами с генотипами *AA* и *GG* (*СМА1*), 4 – между группами с генотипами *AA* и *AC* (*AGTR1*)

Ген *ACE* кодирует ангиотензинпревращающий фермент, который катализирует превращение неактивного ангиотензина I в ангиотензин II. В данном гене описано более 160 полиморфизмов [10]. Особый интерес для исследований представляет *I/D*-полиморфизм 16 интрона, обусловленный наличием *Alu*-повтора длиной 287 п.н. (*I-insertion*) или его отсутствием (*D-deletion*). Отмечена связь *I/D*-полиморфизма с уровнем ангиотензин-превращающего фермента в плазме и некоторых тканях, прежде всего в миокарде: у лиц, гомозиготных по аллелю *D*, содержание фермента увеличено почти в два раза по сравнению с гомозиготными носителями аллеля *I* [11]. Гетерозиготный генотип характеризуется промежуточным значением уровня ангиотензин-превращающего фермента. Показано, что полиморфизм *I/D* гена *ACE* влияет на выраженность клинических проявлений различных сердечно-сосудистых заболеваний, однако результаты исследований достаточно противоречивы. Некоторые исследователи установили связь между полиморфизмом гена *ACE* и гипертрофией левого желудочка [3, 12], в то время как другие такой взаимосвязи не выявили [2, 13]. Также обсуждается роль полиморфизма гена *ACE* в развитии фиброза при ГКМП, который играет важную роль в становлении диастолической дисфункции при этом заболевании [14].

В нашем исследовании при анализе степени выраженности эхокардиографических показателей в зависимости от *I/D*-полиморфизма гена *ACE* (табл. 2) было обнаружено, что показатели ТМЖП, ММ ЛЖ и ИММ значимо не различались, за исключением показателя ТЗС ЛЖ, который был значимо выше ($P = 0,013$) у пациентов с генотипом *ID* по сравнению с носителями генотипа *II*.

Ген *СМА1* кодирует фермент химазу, ответственный за альтернативный путь биосинтеза ангиотензина II. Химаза обладает даже большей ферментативной активностью, чем ангиотензин-превращающий фермент. Экспериментальные исследования показали, что в клетках сердца химаза определяет 75–80% синтеза ангиотензина II. В 5'-нетранслируемой области гена *СМА1* обнаружена точечная замена аденина на гуанин в положении –1903. Показано, что наличие аллеля *G* снижает образование ангиотензина II в эндотелии сосудов [15].

В проведенном нами исследовании при изучении влияния *-1903A>G* полиморфизма гена *СМА1* на значения эхокардиографических показателей (табл. 2) было обнаружено, что у пациентов с генотипом *AA* масса миокарда левого желудочка и толщина задней стенки ЛЖ были статистически значимо больше, чем у носителей генотипов *GA* ($p=0,009$ и $p=0,02$, соответственно) и *GG* ($p = 0,049$ и $p = 0,02$, соответственно). Полученные результаты подтверждают описанную в литературе ассоциацию генотипа *AA* с развитием гипертрофии ЛЖ [15]. Аналогичные данные были получены Каплуновой и соавт. при исследовании 186 пациентов с ГКМП: у носителей аллеля *A* наблюдалась большая масса миокарда, чем у гомозигот *GG* [16]. Возможно, такая ассоциация связана с тем, что наличие аллеля *G* снижает образование ангиотензина II, который выполняет функцию фактора роста кардиомиоцитов, вызывая гипертрофию миокарда.

Ген *AGTR1* кодирует рецептор ангиотензина II типа 1, который опосредует основные сердечно-сосудистые эффекты ангиотензина II. Существуют более 20-ти полиморфных вариантов этого гена [17]. Наибольшее клиническое значение имеет полиморфизм, локализованный в 3'-нетранслирующем регионе гена, приводящий к замене аденина на цитозин в 1166 позиции (*1166A>C*). Количество исследований, посвященных роли генотипа *AGTR1* в развитии гипертрофии ЛЖ, достаточно велико, но их весьма противоречивые результаты не позволяют на сегодняшний день сделать окончательный вывод об ассоциации данного клинического признака с *1166A>C* полиморфизмом гена *AGTR1*, который влияет на функциональную активность рецептора. Ряд исследований продемонстрировал, что носители аллеля *C* и генотипа *CC* имеют более высокие значения ИММ ЛЖ среди больных ГКМП [18, 19], некоторые авторы такой ассоциации не выявили [2]. М.Д. Смирнова и соавторы [20] при исследовании пациентов с ГКМП показали, что у носителей генотипа *AA* наблюдалась большая выраженность гипертрофии ЛЖ по данным ЭКГ (индекс Соколова $35,2 \pm 16,6$ против $20,9 \pm 16,5$, $P < 0,05$), при этом достоверных различий по степени гипертрофии ЛЖ, размерам полостей и сократимости ЛЖ между носителями генотипов *AA* и *AC* не выявлено, однако обнаружена достоверная разница по наличию обструкции

выносящего тракта ЛЖ: у пациентов с генотипом *AA* она встречается статистически значимо чаще, чем у пациентов с генотипом *AC*.

При изучении ассоциации *1166A>C* полиморфизм гена *AGTR1* у пациентов с ГКМП со степенью выраженности показателей гипертрофии (табл. 2) нами была выявлена связь данного полиморфизма с массой миокарда ЛЖ: у пациентов с генотипом *AA* масса миокарда ЛЖ была выше, чем у носителей аллеля *C*, при этом достоверно ($P = 0,022$) по сравнению с пациентами с гетерозиготным генотипом *AC*. Полученные нами результаты указывают на то, что фактором риска развития гипертрофии ЛЖ является генотип *AA*.

Ген *CYP11B2* кодирует альдостеронсинтазу, которая катализирует три отдельных реакции превращения 11-дезоксикортикостерона в альдостерон. Идентифицировано семь полиморфизмов данного гена. Наиболее изучен полиморфизм в 5'-конце этого гена – замена цитозина тиминном в -344-й позиции, который приводит к изменению связывания с фактором транскрипции SF-1 и, таким образом, может влиять на экспрессию гена [9]. Известно, что повышение активности фермента альдостеронсинтазы приводит к увеличению продукции альдостерона, который является стимулятором клеточной гипертрофии и фиброза в сердечно-сосудистой системе. Ряд исследований продемонстрировал зависимость массы миокарда левого желудочка от уровня альдостерона в плазме [21]. Исходя из возможной зависимости уровня секреции альдостерона от полиморфизма гена *CYP11B2*

были предприняты исследования с целью поиска взаимосвязи *-344C>T* полиморфизма этого гена и гипертрофии миокарда. Результаты таких исследований оказались весьма противоречивы: в большинстве исследований аллель *C* являлся аллелем риска развития гипертрофии [22, 23], хотя в некоторых исследованиях фактором риска являлся аллель *T* [24]. Вариабельность результатов при исследовании ГКМП может быть частично объяснена популяционной гетерогенностью пациентов.

В проведенном нами исследовании не выявлено ассоциации *-344C>T* полиморфизма гена *CYP11B2* со степенью выраженности показателей гипертрофии миокарда (табл. 2).

Наряду с процессом ремоделирования левого желудочка, в гипертрофированном миокарде создаются предпосылки для возникновения аритмогенных участков за счет увеличения интерстициального фиброза. Для ГКМП характерны опасные для жизни аритмии, которые в ряде случаев приводят к внезапной смерти. У 90–95% больных ГКМП при холтеровском мониторинге ЭКГ выявляются различные виды жизнеугрожающих аритмий (частые суправентрикулярные и желудочковые экстрасистолы, неустойчивые пароксизмы желудочковой тахикардии, мерцательная аритмия и т. д.), а также признаки ишемии миокарда (депрессия сегмента ST и инверсия зубца T) [1, 25]. В табл. 3 представлены различные аллельные варианты генов *ACE*, *CM1A1*, *AGTR1* и *CYP11B2* и значения показателей ХМ ЭКГ у пациентов с ГКМП.

Таблица 3

Значения электрокардиографических показателей у пациентов с ГКМП с различными генотипами

Генотипы	Показатели (M ± SD; Me [25%;75%])				
	QTc, мс	QTcd, мс	Эпизоды ST	Глубина ST, мм	Продолжительность ST, мин
ACE					
<i>II</i> , n = 52	419,2 ± 38,7	43,2 ± 20,8	4 [2; 8]	2,6 [2,0; 4,3]	25 [15; 75]
<i>ID</i> , n = 119	430,5 ± 37,8	41,7 ± 18,5	2 [1; 5] ¹	2,4 [1,5; 3,6]	30 [15; 75]
<i>DD</i> , n = 75	427,2 ± 38,0	52,8 ± 21,8^{2,3}	4 [2; 7]	2,4 [1,5; 3,3]	25 [11; 60]
CM1A1					
<i>AA</i> , n = 127	421,6 ± 38,6	41,7 ± 12,2	3 [1; 5]	2,4 [1,5; 3,1]	25 [15; 60]
<i>GA</i> , n = 107	428,4 ± 37,9	45,0 ± 17,8	3 [1; 5]	2,5 [1,5; 3,5]	25 [11; 60]
<i>GG</i> , n = 52	429,9 ± 38,0	52,4 ± 31,7	4 [2; 8]	2,5 [1,8; 3,8]	35 [18; 90]

Продолжение табл. 3

Генотипы	Показатели (M ± SD; Me [25%;75%])				
	QTc, мс	QTcd, мс	Эпизоды ST	Глубина ST, мм	Продолжительность ST, мин
AGTR1					
AA, n = 127	429,2 ± 36,8	45,4 ± 17,9	4 [2; 7]	2,5 [1,5; 3,4]	25 [15; 60]
AC, n = 107	423,3 ± 40,2	45,3 ± 23,4	3 [2; 5]	2,5 [1,8; 3,6]	30 [15; 90]
CC, n = 15	430,1 ± 34,5	48,1 ± 20,5	3 [1; 5]	2,5 [1,3; 3,6]	30 [6; 120]
CYP11B2					
CC, n = 65	427,8 ± 36,5	43,0 ± 13,8	3 [2; 6]	2,4 [1,5; 3,4]	25 [10; 60]
CT, n = 118	424,7 ± 38,2	47,6 ± 25,3	4 [2; 8]	2,5 [1,7; 3,5]	30 [15; 60]
TT, n = 64	429,6 ± 40,4	43,9 ± 15,1	2 [2; 5]⁴	2,5 [1,5; 3,8]	25 [12; 90]

Примечание: цифрами обозначены значимые различия, $P < 0,05$: 1 – между группами с генотипами *II* и *ID* (*ACE*); 2 – между группами с генотипами *ID* и *DD*; 3 – между группами с генотипами *II* и *DD*; 4 – между группами с генотипами *CT* и *TT* (*CYP11B2*)

В настоящее время большое внимание уделяется прогностической роли длительности и дисперсии скорректированного интервала (QT) как маркеров развития фатальных аритмий и внезапной сердечной смерти у больных с различной сердечно-сосудистой патологией [26]. Дисперсия интервала QT (QTcd) отражает неомогенность процессов реполяризации в миокарде, лежащую в основе его электрической нестабильности и вызывающую развитие аритмий и внезапной сердечной смерти у пациентов с различной патологией. Механизм увеличения дисперсии QT при ГКМП до сих пор неясен. Некоторые исследователи предполагают, что увеличение QTcd может быть связано с выраженностью гипертрофии ЛЖ [27], в то время как другие считают, что к увеличению дисперсии QT могут привести такие характерные особенности ГКМП, как фиброз и нарушение пространственной ориентации миофибрилл и кардиомиоцитов.

В нашем исследовании при оценке уровня среднего значения дисперсии скорректированного интервала в зависимости от генотипа *ACE*

было обнаружено, что у носителей генотипа *DD*, значения QTcd были достоверно выше ($P < 0,001$), чем у пациентов с генотипами *II* и *ID* (табл. 3). Аналогичные результаты были представлены в исследовании Takahashi и соавт. [28], который продемонстрировал, что генотип *DD* ассоциирован с увеличением QTcd независимо от степени гипертрофии ЛЖ среди пациентов с эссенциальной гипертензией.

Что же касается показателей ишемии, то у пациентов с генотипом *II* наблюдалась наибольшая выраженность ишемических изменений (статистически значимо большее число эпизодов депрессии *ST* ($P = 0,019$) и высокий уровень глубины депрессии *ST* ($P = 0,051$)).

На характер ишемии оказывал влияние также полиморфизм гена *CYP11B2*: у носителей генотипа *CT* число эпизодов депрессии сегмента *ST* было статистически значимо выше ($P = 0,046$), чем у пациентов с генотипом *TT*.

Роль же *1166A>C* полиморфизма гена *AGTR1* и *-1903A>G* полиморфизма гена *СМА1* в степени выраженности показателей ЭКГ нами не выявлена.

Заключение

Таким образом, в нашем исследовании было обнаружено влияние *I/D*-полиморфизма гена *ACE*, *-1903A>G* полиморфизма гена *СМА1* и *1166A>C* полиморфизма гена *AGTR1* на выраженность гипертрофии миокарда левого желудочка у пациентов с гипертрофической

кардиомиопатией, выявлена ассоциация *II* генотипа гена *ACE* и *CT* генотипа гена *CYP11B2* с большей степенью выраженности ишемических изменений, а также *DD* генотипа гена *ACE* с увеличением дисперсии скорректированного интервала *QTcd*.

Список использованных источников

1. Амосова, Е.Н. Кардиомиопатии / Е.Н. Амосова. – Киев: Книга плюс, 1999. – 213 с.
2. Role of candidate modifier genes of the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy / R. Brugada [et al.] // *J. Investig. Med.* – 1997. – Vol. 45. – P. 542–551.
3. Angiotensin-converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy / M. Lechin [et al.] // *Circulation.* – 1995. – Vol. 92. – P. 1808–1812.
4. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and left ventricular hypertrophy. The case against an association / M.P. West [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1997. – Vol. 432. – P. 117–122.
5. Mathew, C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA / C.C. Mathew // *Methods Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 2. – P. 31–34.
6. Insertion-deletion polymorphism of the ACE gene modulates reversibility of endothelial dysfunction with ACE Inhibition / A. Prasad [et al.] // *Circulation.* – 2000. – Vol. 102. – P. 35–41.
7. 1166 A/C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene and the response to short-term infusion of angiotensin II / K.F. Hilgers [et al.] // *Circulation.* – 1999. – Vol. 100. – P. 1394–1399.
8. Angiotensin-converting enzyme and heart chymase gene polymorphisms in hypertrophic cardiomyopathy // A. Pfeuter [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 1996. – Vol. 78. – P. 362–364.
9. Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass, and function / M. Kupari [et al.] // *Circulation.* – 1998. – Vol. 97. – P. 569–575.
10. ACE polymorphisms / F.A. Sayed-Tabatabaei [et al.] // *Circulation Research.* – 2006. – Vol. 98. – P. 1123–1133.
11. Полиморфизм ангиотензинпревращающего фермента и NO-синтазы у лиц с артериальной гипертензией, гипертрофией левого желудочка и гипертрофической кардиомиопатией / В.А. Степанов [и др.] // *Генетика.* – 1998. – № 34. – С. 1578–1581.
12. The influence of the angiotensin I converting enzyme genotype in familial hypertrophic cardiomyopathy varies with the disease gene mutation / F. Tesson [et al.] // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 1997. – Vol. 29. – P. 831–838.
13. Lack of association of polymorphisms of the angiotensin converting enzyme and angiotensinogen genes with nonfamilial hypertrophic or dilated cardiomyopathy / Y. Yamada [et al.] // *Am. J. Hypertens.* – 1997. – Vol. 10. – P. 921–928.
14. Effect of high degree of hypertrophy on left ventricular diastolic function in patients with hypertrophic cardiomyopathy / R. Lombardi [et al.] // *J. Amer. Coll. Cardiology.* – 2002. – Vol. 39. – P. 370.
15. Impact of polymorphisms in the rennin-angiotensin-aldosterone system on hypertrophic cardiomyopathy / E. Orenes-Piñero [et al.] // *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* – 2011. – Vol. 12, № 4. – P. 521–530.
16. Каплунова, В.Ю. Клинико-генетические подходы в определении вариантов течения, прогноза и стратификации риска внезапной сердечной смерти у больных гипертрофической кардиомиопатией: автореф. дис. ... д-ра мед. Наук: 14.01.05 / В.Ю. Каплунова; Первый Московский гос. Мед. ун-т им. И.М. Сеченова. – М., 2011. – 53 с.
17. Современные методы анализа полиморфизма гена рецептора АТ–II 1–го типа при фармакотерапии артериальной гипертензии / О.В. Шевченко [и др.] // *Биомедицина.* – 2010. – № 3. – С. 169–171.
18. AT1 receptor A/C 1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy / J.M. Kofflard [et al.] // *Hypertension.* – 1998. – Vol. 32. – P. 825–830.
19. Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the rennin-angiotensin-aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy / M.J. Perkins [et al.] // *Eur. Heart. J.* – 2005. – Vol. 26. – P. 2457–2462.
20. Зависимость клинической картины гипертрофической кардиомиопатии от полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой системы / М.Д. Смирнова [и др.] // *Кардиологический вестник.* – 2009. – № 2. – С. 19–23.
21. Association between circulating components of the renin angiotensin aldosterone system and left ventricular mass / H. Schunkert [et al.] // *J. Br. Heart.* – 1997. – Vol. 77. – P. 24–31.

22. Dzau, V.J. Cell biology and genetics of angiotensin in cardiovascular disease / V.J. Dzau // J. Hypertens. – 1994. – Vol. 12. – P. S3–S10.
23. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension / Y. Miyamoto [et al.] // Hypertension. – 1998. – Vol. 32. – P. 3–8.
24. Cardiac aldosterone in subjects with hypertrophic cardiomyopathy / W. Chai [et al.] // J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst. – 2006. – Vol. 7. – P. 225–230.
25. Гипертрофическая кардиомиопатия: современные аспекты диагностики и лечения / В.В. Сыволап [и др.] // Запорожский медицинский журнал. – Т. 13, № 5. – С. 72–75.
26. The separate and joint effects of prolonged QT interval and heart rate on mortality / N.H. Kim [et al.] // Atherosclerosis. – 2010. – Vol. 209, № 2. – P. 539–544.
27. QT dispersion and sudden unexpected death in chronic heart failure / C.S. Barr [et al.] // Lancet. – 1994. – Vol. 343. – P. 327–329.
28. Angiotensin-converting enzyme-gene polymorphism is associated with collagen I synthesis and QT dispersion in essential hypertension / T. Takahashi [et al.] // J. Hypertens. – 2003. – Vol. 21, № 5. – P. 985–991.

Дата поступления статьи 16 августа 2013 г.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

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

Введение

Всемирная организация здравоохранения признала метаболический синдром (МС) новой пандемией XXI века. В развитых странах каждый четвертый гражданин страдает данным недугом, и, согласно расчетам экспертов, в ближайшие годы будет происходить увеличение темпов роста заболеваемости [1]. Необходимо также подчеркнуть, что большинство пациентов с МС – это люди активного трудоспособного возраста, т.е. наиболее продуктивная и значимая часть общества. Кроме того, за последние два десятилетия изучаемый синдром демонстрирует устойчивый рост среди молодежи. Однако до сих пор МС не относят к разряду истинных заболеваний, поэтому он не включен в перечень Международной классификации болезней 10-го пересмотра.

Метаболический синдром – результат взаимодействия внешних факторов, образа жизни (диета, физическая активность, стресс, забота о здоровье и т.д.) с индивидуальными генетическими особенностями.

Существует множество критериев определения метаболического синдрома [2–4], наиболее традиционным из которых является наличие минимум трех из следующих компонентов [5]:

- центральное ожирение (окружность талии ≥ 102 см у мужчин, ≥ 88 см у женщин);
- нарушение регуляции глюкозы (уровень глюкозы в плазме натощак ≥ 110 мг/дл);
- артериальная гипертензия ($\geq 130/85$ мм рт. ст.);
- дислипидемия (уровень триглицеридов ≥ 150 мг/дл, уровень липопротеидов высокой плотности < 40 мг/дл у мужчин, < 50 мг/дл у женщин).

Другими компонентами, которые часто ассоциированы с МС, являются повышенные уровни С-реактивного белка и ингибитора активатора плазминогена, а также пониженный уровень плазменного адипонектина.

Среди основных средовых факторов, способствующих развитию МС, выделяют избыточное питание, гиподинамию, курение, чрезмерное употребление алкоголя. В последнее время появились многочисленные научные работы, посвященные генетическим аспектам МС.

Наследственный характер МС подтвержден наблюдениями за монозиготными близнецами, у которых конкордантность по этому заболеванию достигает 90%. По разным данным, вклад наследственности в развитие МС составляет 51–60% [6].

По некоторым данным, первопричиной МС может быть проявление эффектов полиморфных вариантов обширной группы взаимодействующих генов, принимающих участие в реализации эффектов инсулина, глюкозы, факторов пролиферации пероксисом, ангиотензинпревращающего фермента и т.д. В основе генетической составляющей МС как комплексного генетического заболевания, лежат как моногенные формы инсулиновой резистентности, так и сочетанный характер полиморфизмов целого ряда генов [7], которые влияют на распределение жировой ткани в организме, пищевое поведение, активность ферментных систем, участвующих в регуляции метаболических процессов. Особое значение в системе гомеостаза организма и поддержании нормального углеводного обмена придается функциональному состоянию β -клеток поджелудочной железы, которое, в свою очередь, также предопределяется генетическими факторами.

В случае моногенных форм синдрома единственная генная мутация вызывает обычно ранние фенотипические проявления (например, мутации в генах *LEPR* и *MC4R* отвечающих за контроль аппетита [8, 9]). Такие формы достаточно хорошо изучены и составляют

небольшую часть среди МС, они обусловлены полностью наследственностью и не корректируются профилактическими мерами.

Гораздо больший интерес в данном аспекте представляет МС, имеющий генетическую предрасположенность и развивающийся под влиянием средовых факторов. В этом случае гены проявляют себя лишь под действием предрасполагающих факторов, среди которых определяющее значение имеют особенности образа жизни, а именно гиподинамия и несбалансированное питание с избыточным поступлением калорий.

В связи с этим, все больше внимания исследователи уделяют изучению молекулярно-генетических факторов предрасположенности к МС и анализу ассоциации их полиморфизмов с различными компонентами синдрома. Для этого используют различные подходы, один из которых – анализ генов-кандидатов предрасположенности к МС.

Имеются сообщения об ассоциации МС с полиморфизмами генов, продукты которых вовлечены в метаболизм липопротеинов (гены *APOA1*, *APOA5*, *CETP*, *LDLR*) [10, 11], аднергическую передачу сигнала (гены *ADRA1A*, *ADRB1*, *ADRB3*) [12], синтез липидов и дифференцировку адипоцитов (гены *SCD1*, *LPIN1*

и *PPARG*) [13, 14], секрецию цитокинов (гены *IL6* и *ADIPOQ*) [15], контроль аппетита (гены *LEPR*, *MC4R* и *FTO*) [11, 16], функцию бета-клеток (гены *TCF7L2* и *WFS1*) [11, 17], определение чувствительности к глюкозе (гены *GCK* и *GCKR*) [18], передачу сигнала инсулина/инсулино-подобного ростового фактора (гены *INSR*, *SHIP2*, *IGF2BP2*) [18, 19] и функционирование митохондрий (ген *UCP2*) [20].

Известно, что проявление эффектов полиморфных вариантов генов зависит от пола, возраста, этнической принадлежности их носителей [17]. В связи с этим, изучение генов предрасположенности к МС в каждой конкретной популяции является необходимым и актуальным. Это позволит оценить взаимодействие генетических и внешнесредовых факторов, метаболических и сосудистых нарушений, определяющих риск развития таких сердечно-сосудистых осложнений, как инфаркт миокарда, инсульт и застойная сердечная недостаточность.

Выявление аллельных вариантов генов, обуславливающих повышенный генетический риск развития МС, позволит более эффективно проводить мероприятия по профилактике данного заболевания, а также правильно выбирать методы лечения, существенно улучшить прогноз и избежать возможных осложнений.

Материалы и методы

В исследовании были проанализированы образцы ДНК 126 человек с МС в возрасте от 20 до 84 лет (средний возраст $53,03 \pm 14,98$), 73 мужчины, 53 женщины, которые проходили обследование в Минском городском эндокринологическом центре. Контрольная группа состояла из случайной выборки жителей города Минска и включала 362 человека.

Выделение ДНК из клеток Buccalного эпителия и лейкоцитов периферической крови проводили с помощью классической фенол-хлороформной экстракции [22]. Данный метод обладает хорошей воспроизводимостью, способен обеспечить высокую степень чистоты ДНК, полученные этим методом образцы стабильны и могут храниться длительное время.

Исследования проводили с использованием амплификатора *Applied Biosystems™ Thermal Cycler 2720 (BIO-RAD, США)*, а также системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени *CFX96 (BIO-RAD, США)*.

Для определения генотипа по полиморфизму гена *ACE* использовали двухпраймерную систему. Для генотипирования образцов по генам *PPARG*, *TCF7L2* применяли методику на основе *Tetra-primer ARMS PCR* с использованием отдельных стандартных компонентов реакционной смеси и аллель-специфичных праймеров. Разделение продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле. Визуализировали в проходящем УФ-свете после окраски в растворе бромистого этидия.

Идентификацию полиморфизма гена *UCP2* проводили с помощью *Real-time PCR*, с использованием специально синтезированных меченных праймеров. Для выявления мутации *G20210A* и мутации *FVL* генов 2-го и 5-го факторов свертываемости крови применяли методику на основе *Multiplex Real-time PCR*, которая позволяет определить генотип образца одновременно по двум мутациям. В результате амплификации флуоресценция меченных аллель-специфичных

зондов возрастает пропорционально росту количества копий участка исследуемого гена. Каждый краситель флуоресцирует в определенном спектре, что позволяет сделать заключение о генотипе исследуемого образца.

В табл. 1 приведены нуклеотидные последовательности использованных специфических праймеров. Температурно-временные условия проведения ПЦР подбирали экспериментально.

Таблица 1

Последовательность ПЦР-праймеров, использованных для определения полиморфизмов генов предрасположенности к МС

Ген	Полиморфизм	Праймеры
<i>ACE</i>	<i>I/D</i>	F: 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' R: 5'-GATGTGGCCATCACATTGGTCAGAT-3'
<i>PPARG</i>	<i>Pro12Ala</i>	F: 5'-AATTACAGCAAACCCCTATTCCATGC-3' R: 5'-ATTTTACCCTTACATAAATGCCCCCA-3' C: 5'-GAAACTCTGGGAGATTCTCCTATTGTCC-3' G: 5'-GTATCAGTGAAGGAATCGCTTTCAGC-3'
<i>TCF7L2</i>	<i>C/T</i>	1: 5'-AATTTTTTTCACATGTGAAGACATAC-3' 2: 5'-AAGAGATGAAATGTAGCAGTGAAG-3' C: 5'-TAGAGAGCTAAGCACTTTTTAGAGAC-3' T: 5'-CTCATACGGCAATTAATATAGAA-3'
<i>UCP2</i>	<i>Ala55Val</i>	F: 5'-TTGCAGATCCAAGGAGAAAGTCA-3' R: 5'-CCCTCAGTACGCACCATGGT-3' 1: 5'-FAM-CGCTACAGCCAGCGCCAGTACC-BHQ1-3' 2: 5'-ROX-CGCTACAGTCAGCGCCAGTACCG-BHQ2-3'
<i>FII</i>	<i>G20210A</i>	PTII(G) 5'-Cy5-TGACTCTCAGCGAGCCTCAATGCT-BHQ2-3' PTII(A) 5'-TET-TGACTCTCAGCAAGCCTCAATGCT-BHQ1-3' PTII(1) 5'-CTGGAACCAATCCCGTGAAAGA-3' PTII(2) 5'-CCAGAGAGCTGCCCATGAATAG-3'
<i>FV</i>	<i>1691 G>A</i>	FVL(A) 5'-FAM-ATCCCTGGACAGGCAAGGAATACA-BHQ1-3' FVL(G) 5'-ROX-ATCCCTGGACAGGCGAGGAATACA-BHQ2-3' FVL(1) 5'-AGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCA-3' FVL(2) 5'-CCCATTATTTAGCCAGGAGACC-3'

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью стандартного критерия χ^2 , для редких генотипов расчет проводился с учетом поправки Йетса. Для оценки влияния полиморфизмов на риск развития заболевания при-

меняли коэффициент соотношения шансов (OR). Распределение соответствующих генотипов в исследуемых группах для всех проанализированных полиморфизмов проверяли на соответствие ожидаемому распределению Харди-Вайнберга.

Результаты и обсуждение

Для проведения молекулярно-генетического анализа нами были выбраны гены, оказывающие влияние на различные компоненты метаболического синдрома.

Ген *ACE* кодирует аминокислотную последовательность ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), который является важным физиологическим регулятором арте-

риального давления и водно-солевого обмена. Полиморфизм *Alu Ins/Del* гена *ACE* имеет два варианта, отличающихся наличием (*insertion, I*) или отсутствием (*deletion, D*) *Alu*-последовательности в интроне гена *ACE* [23]. С данным полиморфизмом связана различная степень экспрессии гена *ACE*. Вариант *D* характеризуется более активной выработ-

кой АПФ, что является фактором риска артериальной гипертензии и других сердечно-сосудистых заболеваний.

Ген *TCF7L2* кодирует транскрипционный фактор, который является составной частью сигнального пути *Wnt*. Данный сигнальный путь задействован в регуляции механизмов роста, развития и функционирования различных клеток, в том числе и β -клеток поджелудочной железы [24]. Связь полиморфизма *C/T* гена *TCF7L2* с развитием сахарного диабета 2 типа (СД 2) была подтверждена во многих ассоциативных исследованиях в популяциях разной этнической природы [25]. Было показано, что носительство генотипов с минорным аллелем увеличивает риск развития СД 2 типа в среднем в 1,5 раза [26]. Однако популяционные частоты в различных странах имели значительные различия.

Ген *PPARG2* кодирует гамма рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом. Естественными лигандами этих рецепторов являются свободные жирные кислоты и эйкозаноиды. После активации рецептор перемещается в клеточное ядро и активирует транскрипцию большого числа генов. Ген *PPARG2* экспрессируется в жировой ткани и регулирует дифференцировку адипоцитов и генную экспрессию в адипоцитах. Кроме того, ген экспрессируется и в β -клетках поджелудочной железы [27]. Поэтому, возможно, влияет на секрецию инсулина поджелудочной железой.

Полиморфизм *Pro12Ala* гена *PPARG2* связан с риском ожирения, инсулинорезистентности и развития СД 2 типа.

Ген разобщающего белка 2 (*UCP2*) принадлежит к семейству митохондриальных транспортных белков, разобщающих окислительное фосфорилирование. *UCP2* выступает в роли канала, по которому жирные кислоты могут покидать митохондриальный матрикс, регулируя процесс их окисления [28]. Показано, что *UCP2* благодаря своей активности, играет важную роль в патофизиологии СД2. В частности, гипергликемия вызывает патологическую активацию *UCP2* в панкреатических островках, которая, в свою очередь, приводит к снижению стимулированной глюкозой секреции инсулина [29].

Мутация 5-го фактора свертываемости крови (*FVL*, лейденская мутация) и мутация 2-го фактора (*G20210A*, мутация гена протромбина) являются известными факторами риска возникновения тромбозов и тромбоэмболий. Некоторые данные указывают на тесную связь нарушения процесса коагуляции крови с развитием метаболического синдрома.

Результаты генотипирования основной и контрольной группы по анализируемым генам предрасположенности к метаболическому синдрому представлены в табл. 2.

Распределение соответствующих генотипов в исследуемых группах для всех проанализированных полиморфизмов соответствовало ожидаемому распределению Харди-Вайнберга.

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей изученных полиморфизмов в группе лиц с МС и в контрольной группе

Ген, полиморфизм	Генотипы, аллели	Частота, %		χ^2	P	OR (95% CI)
		МС, n = 126	Контроль, n = 362			
<i>ACE I/D</i>	<i>I/I</i>	14,3	23,8	4,49	0,03*	0,53 (0,31–0,93)
	<i>I/D</i>	54,0	50,3			1,16 (0,77–1,74)
	<i>D/D</i>	31,7	25,9			1,33 (0,85–2,06)
	<i>I</i>	41,3	48,9	4,36	0,04*	0,73 (0,55–0,98)
	<i>D</i>	58,7	51,1			1,36 (1,02–1,82)
<i>TCF7L2</i>	<i>T/T</i>	7,2	6,4	8,10	<0,01*	1,13 (0,51–2,52)
<i>C/T</i>	<i>T/C</i>	44,4	27,9			2,07 (1,36–3,15)
	<i>C/C</i>	48,4	65,7			0,49 (0,32–0,74)
	<i>T</i>	29,4	20,3	8,76	<0,01*	1,63 (1,18–2,26)
	<i>C</i>	70,6	79,7			0,61 (0,44–0,85)

Продолжение табл. 2

Ген, полиморфизм	Генотипы, аллели	Частота, %		χ^2	P	OR (95% CI)
		МС, n = 126	Контроль, n = 362			
PPARG Pro/Ala	Ala/Ala	1,6	3,0	1,30	0,52	0,51 (0,11–2,35)
	Pro/Ala	19,8	22,7			0,85 (0,51–1,40)
	Pro/Pro	78,6	74,3			1,27 (0,78–2,06)
	Ala	11,5	14,4	1,30	0,26	0,78 (0,50–1,20)
	Pro	88,5	85,6			1,29 (0,83–2,00)
UCP2 Ala/Val	Ala/Ala	37,3	26,0	6,48	0,04*	1,70 (1,10–2,61)
	Ala/Val	42,9	54,1			0,64 (0,42–0,96)
	Val/Val	19,8	19,9			1,00 (0,60–1,66)
	Ala	58,7	53,0	2,44	0,12	1,26 (0,94–1,68)
	Val	41,3	47,0			0,79 (0,59–1,06)
G20210A	G/G	96,8	97,8	0,36	0,83	0,69 (0,20–2,33)
	G/A	3,2	2,2			1,45 (0,43–4,90)
	A/A	0,0	0,0			–
	G	98,4	98,9	0,36	0,55	0,69 (0,21–2,32)
	A	1,6	1,1			1,44 (0,43–4,84)
FVL	G/G	97,6	96,1	0,61	0,74	1,65 (0,47–5,84)
	G/A	2,3	3,9			0,61 (0,17–2,15)
	A/A	0,0	0,0			–
	G	98,8	98,1	0,60	0,44	1,64 (0,47–5,74)
	A	1,2	1,9			0,61 (0,17–2,14)

* – различия статистически достоверны.

По результатам генотипирования выявлено статистически достоверное различие в распределении частот генотипов и аллелей полиморфизма *I/D* гена *ACE* среди пациентов с МС и контрольной группой ($\chi^2 = 4,49$ и $\chi^2 = 4,36$, соответственно, $P < 0,05$). При этом наличие генотипа *D/D* способствует увеличению риска заболевания в 1,33 раза, а частота аллеля риска *D* достоверно выше среди пациентов с МС по сравнению с контролем (OR = 1,36 95% CI 1,02–1,82).

Взаимосвязь полиморфизма *I/D* гена *ACE* с уровнем артериального давления хорошо изучена и считается доказанной. Показано, что уровень циркулирующего в крови ангиотензин-превращающего фермента у носителей *D/D* генотипа был в 2 раза выше, чем у *I/I* индивидуумов, у *I/D* индивидуумов был промежуточный уровень [21]. В то же время объяснить взаимосвязь данного полиморфизма с развитием МС только его влиянием на уровень артериального давления не представляется возможным. Вероятно, полиморфизм *I/D* гена *ACE* оказывает

влияние и на другие компоненты МС. Некоторые исследователи предполагают, что ренин-ангиотензиновая система может влиять на секрецию адипокинов и инсулина [30].

Наиболее выраженные различия между частотами генотипов и аллелей в исследованных выборках наблюдалось для полиморфизма *C/T* гена *TCF7L2* ($\chi^2 = 8,10$ и $\chi^2 = 8,76$, соответственно, $P < 0,01$). В связи с низкой частотой гомозигот *T/T* в популяции, генотипом риска для этого полиморфизма является гетерозигота *T/C*: среди пациентов с МС частота этого генотипа значительно выше, чем в контрольной группе (44,4% и 27,9% соответственно). В то же время генотип *C/C* является протекторным (OR = 0,49 95% CI 0,32–0,74). Полученные данные свидетельствуют о значительном вкладе полиморфизма *C/T* гена *TCF7L2* в патогенез развития МС.

Проведенный Yu Tong1 et al. мета-анализ подтвердил достоверную связь данного полиморфизма, как с артериальной гипертензией, так и с сахарным диабетом [31], поэтому выяв-

ление полиморфизма *C/T* гена *TCF7L2* может служить важным прогностическим фактором при определении риска развития МС.

Статистически достоверных различий в распределении частот генотипов и аллелей полиморфизма *Pro12Ala* гена *PPARG2* в исследованных группах нами не выявлено, частота аллеля *Ala* в контрольной группе была не намного выше, чем в группе с МС. По литературным данным [32], частота гетерозигот в популяциях европейского типа достигает 20%, гомозиготных носителей генотипа *Ala/Ala* – около 2%, что вполне соотносится с данными, полученными в нашем исследовании.

Проведенный Gouda H.N. et al. мета-анализ, включающий исследование более чем 30 000 человек, показал протективный эффект наличия *12Ala* аллеля в генотипе. Этот эффект включал не только предупреждение развития СД2, но и большую чувствительность к инсулину, то есть предупреждение развития инсулинорезистентности, что особенно проявлялось у лиц с ожирением [32].

При анализе результатов генотипирования по полиморфизму *Ala/Val* гена *UCP2* нами наблюдалось статистически достоверное увеличение частоты гомозигот *Ala/Ala* (OR = 1,70 95% CI 1,10–2,61) среди пациентов с МС по сравнению с контролем ($\chi^2 = 6,48$, $P < 0,05$). При анализе распределения аллелей по этому полиморфизму не было выявлено статистически достоверной зависимости. В то же время

генотип *Ala/Val*, по-видимому, является протекторным (OR = 0,64 95% CI 0,42–0,96).

Исследования физиологической роли белка *UCP2* [24] показали, что он принимает участие в процессе окисления жирных кислот, регуляции работы β -клеток поджелудочной железы, а также влияет на пищевое поведение индивидуума. Таким образом, исследование взаимосвязи полиморфизмов и мутаций генов, ассоциированных с данным белком, с развитием МС является весьма перспективным.

Как показали полученные нами результаты, не наблюдается статистически достоверного отличия в распределении частот генотипов и аллелей среди пациентов с МС и контролем по обоим полиморфизмам генов системы свертываемости крови (*G20210A* и *FVL*). Определенная нами частота встречаемости мутации *G20210A* в контрольной группе (2,2%) соответствует среднеевропейской частоте, описанной в литературе [33]. Исследование полиморфизмов и мутаций генов, оказывающих влияние на реологические свойства крови, у лиц с МС необходимо проводить с целью прогнозирования и предотвращения возможных осложнений в виде тромбозов и тромбоэмболий. Именно изменения в системе гемостаза и фибринолиза при метаболическом синдроме, по мнению некоторых исследователей, являются независимыми и одними из решающих факторов риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний [34, 35].

Заключение

По результатам проведенного исследования, наибольшим вкладом в генетическую предрасположенность к метаболическому синдрому из проанализированных генов обладают *TCF7L2*, *ACE* и *UCP2*. Генетическое тестирование по этим генам можно проводить с целью формирования среди населения групп повышенного риска развития данного заболевания. В то же время, представляет интерес более подробное изучение тех генов, которые в данном исследовании не показали ассоциации с риском развития МС.

Скрининг проанализированных генетических маркеров позволяет проводить раннюю идентификацию групп риска развития метаболического синдрома для проведения своевременных превентивных мероприятий, а также более эффективную терапию, избежать осложнений, снизить инвалидизацию и смертность среди этих пациентов, а также снизить затраты на лечение. Особое значение имеет применимость данного метода для проведения тестирования среди всех возрастных групп до момента появления клинических признаков заболевания.

Список использованных источников

1. Zimmet, P. Preventing type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view / P. Zimmet, J. Shaw, G. Alberti // *Diabetic*

medicine. – 2003. – Vol. 20, № 9. – P. 693–702.

2. World Health Report. Making a Difference. – Geneva: World Health Organization, 1999. – 136 p.

3. Balkau, B. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) / B. Balkau, M.A. Charles // *Diabetic Medicine*. – 1999. – Vol. 16, № 5. – P. 442–443.
4. The metabolic syndrome – a new worldwide definition / K.G. Alberti [et al.] // *Lancet*. – 2005. – Vol. 366, № 9491. – P. 1059–1062.
5. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement / S.M. Grundy [et al.] // *Circulation*. – 2005. – Vol. 112, № 17. – P. 2735–2752.
6. Heritabilities of the metabolic syndrome phenotypes and related factors in Korean twins / J. Sung [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2005. – Vol. 94, № 12. – P. 4946–4952.
7. McCarthy, J.J. Evidence for substantial effect modification by gender in a large-scale genetic association study of the metabolic syndrome among coronary heart disease patients / J.J. McCarthy, J. Meyer, D.J. Moliterno // *Hum Genet*. – 2003. – Vol. 114. – P. 87–98.
8. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction / K. Clement [et al.] // *Nature*. – 1998. – Vol. 392, № 6674. – P. 398–401.
9. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity / C. Vaisse [et al.] // *Nature Genetics*. – 1998. – Vol. 20, № 2. – P. 113–114.
10. Dominant negative mutations in human PPAR gamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension / I. Barroso [et al.] // *Nature*. – 1999. – Vol. 402, № 6764. – P. 880–883.
11. Genetic risk for metabolic syndrome: examination of candidate gene polymorphisms related to lipid metabolism in Japanese people / Y. Yamada [et al.] // *Journal of Medical Genetics*. – 2008. – Vol. 45, № 1. – P. 22–28.
12. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review / C.M. Povel [et al.] // *Obesity Reviews*. – 2011. – Vol. 12, № 11. – P. 952–967.
13. Association between *ADRA1A* gene and the metabolic syndrome: candidate genes and functional counterpart in the PAMELA population / G. Grassi [et al.] // *Journal of Hypertension*. – 2011. – Vol. 29, № 6. – P. 1121–1127.
14. Genetic variation in stearoyl-CoA desaturase 1 is associated with metabolic syndrome prevalence in Costa Rican adults / J. Gong [et al.] // *Journal of Nutrition*. – 2011. – Vol. 141, № 12. – P. 2211–2218.
15. Genetic variants within the *LPINI* gene, encoding lipin, are influencing phenotypes of the metabolic syndrome in humans / S. Wiedmann [et al.] // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57, № 1. – P. 209–217.
16. Adiponectin SNP276 is associated with obesity, the metabolic syndrome, and diabetes in the elderly / W.S. Yang [et al.] // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2007. – Vol. 86, № 2. – P. 509–513.
17. Leptin receptor polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to augment risk of insulin resistance and metabolic syndrome in adults / C.M. Phillips [et al.] // *Journal of Nutrition*. – 2010. – Vol. 140, № 2. – P. 238–244.
18. The search for putative unifying genetic factors for components of the metabolic syndrome / M. Sjogren [et al.] // *Diabetologia*. – 2008. – Vol. 51, № 12. – P. 2242–2251.
19. Association between insulin receptor gene polymorphism and the metabolic syndrome in Han and Yi Chinese / C. Wang [et al.] // *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. – 2012. – Vol. 21, № 3. – P. 457–463.
20. Association of rs780094 in GCKR with metabolic traits and incident diabetes and cardiovascular disease: The ARIC Study / M. Bi [et al.] // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, № 7. – P. e11690.
21. The ACE insertion/deletion polymorphism and its association with metabolic syndrome / B. Xi [et al.] // *Metabolism*. – 2012. – Vol. 61, № 6. – P. 891–897.
22. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 399 с.
23. Weir, M.R. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management / M.R. Weir, V.J. Dzau // *Am. J. Hypertens*. – 1999. – Vol. 12, № 3. – P. 205–213.
24. Jin, T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus / T. Jin // *Diabetologia*. – 2008. – Vol. 51, № 10. – P. 1771–1780.
25. Allele-specific PCR assay to genotype SNP rs7903146 in TCF7L2 gene for rapid screening of diabetes susceptibility / L.A. Dutra [et al.] // *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* – 2008. – Vol. 52, № 8. – P. 1362–1366.

26. 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.
27. The PPARgamma Pro12Ala variant is associated with insulin sensitivity in Russian normoglycaemic and type 2 diabetic subjects / D.A. Chistiakov [et al.] // *Diab. Vasc. Dis. Res.* – 2010. – Vol. 7, № 1. – P. 56–62.
28. Structural organization and mutational analysis of the human uncoupling protein-2 (hUCP2) gene / N. Tu [et al.] // *Life Sci.* – 1999. – Vol. 64. – P. 41–50.
29. The common 866G/A polymorphism in the promoter region of the UCP-2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes in Caucasians from Italy / A. Bulotta [et al.] // *J. Clin. End. Metab.* – 2005. – Vol. 90. – P. 1176–1180.
30. Engeli, S. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the metabolic syndrome / S. Engeli // *Contrib. Nephrol.* – 2006. – Vol. 151. – P. 122–134.
31. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis / Y. Tong [et al.] // *BMC Medical Genetics*. – 2009. – Vol. 10. – P. 15.
32. The association between the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis / H.N. Gouda [et al.] // *Am J Epidemiol.* – 2010. – Vol. 171, № 6. – P. 645–655.
33. Geographic distribution of the 20210G to A prothrombin variant / F.R. Rosendaal [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1998. – Vol. 79. – P. 706–708.
34. Метаболический синдром и тромбофилии в акушерстве и гинекологии / А.Д. Макария [и др.] // Москва: МИА, 2006. – 477 с.
35. Перова, Н.В. Патогенетические основы метаболического синдрома как состояния высокого риска атеросклеротических заболеваний / Н.В. Перова, А.В. Метельская, Р.Г. Оганов // *Международ. мед. журн.* – 2001. – Т. 7, № 3. – С. 6–10.

Дата поступления статьи 11 июня 2013 г.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА *HIF1A* ДЛЯ ОЦЕНКИ ФИЗИЧЕСКОЙ РАБОТОСПОСОБНОСТИ СПОРТСМЕНА

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
²ГУ «Республиканский центр спортивной медицины» МСiT,
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, ул. Свердлова, 9

Введение

Для подготовки спортсменов высшей квалификации затрачиваются огромные средства. Проводятся динамические функциональные обследования спортсменов, позволяющие определить соответствие тренировочных нагрузок функциональным возможностям организма, разрабатываются индивидуальные планы медицинских мероприятий и фармакологического обеспечения. Кроме того, в систему комплексных лечебно-профилактических мероприятий для спортсменов национальных команд включаются новые немедикаментозные методики, повышающие физическую работоспособность и степень адаптации к физическим нагрузкам (криотерапия, озонотерапия, нормобарическая гипоксическая тренировка и др.) [1].

Учреждениями спортивной медицины Республики Беларусь выявлено значительное количество спортсменов, нуждающихся в коррекции тренировочного процесса. По ряду национальных команд общее количество спортсменов, нуждающихся в восстановительных мероприятиях, доходило до 55%. По данным Республиканского центра спортивной медицины, функциональная готовность спортсменов к XXX летним Олимпийским играм 2012 г. в Лондоне была ниже аналогичного периода 2008 г. [2]. Таким образом, следует сделать вывод о недостаточности существующей системы подготовки спортсменов и необходимости ее совершенствования.

Важнейшими и неотъемлемыми составляющими успешной спортивной деятельности являются физические и психологические способности человека, которые на 75–85% обусловлены наследственными факторами [3]. Практика подготовки спортсменов свидетельствует о том, что

вершин мирового спорта могут достичь только те атлеты, которые обладают комплексом как врожденных, так и приобретенных способностей. Внедрение генетического тестирования в практику подготовки спортсменов следует рассматривать как существенный резерв повышения эффективности учебно-тренировочной работы, мер по охране их здоровья, профилактике патологических состояний.

В настоящее время известно большое количество генов, в той или иной степени определяющих предрасположенность к спортивной деятельности [3]. В первую очередь, это гены, регулирующие деятельность сердечно-сосудистой системы, детерминирующие устойчивость к гипоксии, определяющие скоростно-силовые качества и скорость прохождения нервных импульсов [4]. Ген *HIF1A* кодирует альфа-субъединицу фактора, индуцируемого гипоксией. Продукт гена действует как главный регулятор клеточного и системного гомеостатического ответа на гипоксию путем активации транскрипции генов, участвующих в энергетическом метаболизме, эритропоэзе, ангиогенезе и апоптозе [5]. Наличие изменений в последовательности гена *HIF1A* может оказывать влияние на функциональное состояние транскрипционного фактора и его экспрессию, а следовательно, отражать способность организма адаптироваться к недостатку кислорода. Одним из таких полиморфизмов является замена цитозина на тимин в позиции 1772 (*Pro582Ser*; *rs11549465*) [6].

Цель работы – определить информативность молекулярно-генетического тестирования по гену *HIF1A* для оценки физической работоспособности спортсмена.

Материалы и методы

Проведено генетическое тестирование 292 спортсменов различной специализации

(марафон, биатлон, академическая гребля, конькобежный спорт, велоспорт, хоккей, боль-

шой теннис, спортивная акробатика) и 268 человек контрольной группы.

В качестве биологического материала для исследования использовали ДНК и РНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови с помощью набора реагентов для экстракции соответственно РНК и ДНК (Синтол, Россия). Генотипирование по полиморфизму *C1772T HIF1A* осуществляли методом количественной ПЦР с использованием праймеров и TaqMan-зондов собственного дизайна и набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени (Синтол, Россия). Детекцию флюоресценции, а также первичную обработку результатов осуществляли программным обеспечением прибора CFX96, *BIO-RAD* (США) в автоматическом режиме. Для оценки экспрессии гена *HIF1A* использовали технологию относитель-

ного анализа количества мРНК в образцах с помощью реакции обратной транскрипции и последующей ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени) [7]. Для оценки состояния основных источников энергообеспечения мышечной деятельности спортсменов академической гребли использовали систему многофакторной экспресс-диагностики текущего и оперативного состояния обобщенных свойств организма, формирующих физическую работоспособность (система Д-Тест) [1].

Попарное сравнение контрольных и опытных частот проводили с помощью точного критерия Фишера. Различия считали статистически достоверными при $P \leq 0,05$. Для оценки значимости вклада каждого аллеля гена в спортивную успешность вычисляли статистический показатель отношения шансов (*OR*, *odds ratio*).

Результаты и обсуждение

Во всех исследованных группах распределение частот генотипов гена *HIF1A* соответствовало распределению Харди-Вайнберга. Частота встречаемости аллеля *T* гена *HIF1A* в контрольной выборке людей, не занимающихся спортом профессионально, составила 5,6%. Анализ частот встречаемости исследуемого аллеля в группах спортсменов различных видов спорта выявил статистически достоверные отличия от контрольной группы (табл. 1). Более высокие частоты встречаемости исследуемого аллеля *T* характерны для генотипов представителей хоккея с шайбой (13,4% ($OR = 2,61$; $P \leq 0,05$)) и академической гребли (13,2% ($OR = 2,57$; $P \leq 0,05$)). Выявле-

ны также более высокие частоты аллеля *C* у атлетов таких видов спорта как теннис (98,3%, $OR = 3,38$), биатлон (97,2%, $OR = 2,08$), плавание (100%, $OR = 3,19$) и современное пятиборье (100%, $OR = 4,15$), однако достоверных различий с контролем не наблюдалось.

По преобладающему источнику энергии для мышечного сокращения виды спорта разделяются на группы в соответствии с тем, что нагрузки, направленные на формирование скоростно-силовых качеств, отличаются от нагрузок, направленных на формирование выносливости, по интенсивности и объему протекающих в организме биохимических процессов [8].

Таблица 1

Распределение частот аллелей гена *HIF1A* в контрольной выборке и группах спортсменов различных видов спорта

Группы видов спорта	N	Аллели гена, %		P	OR		
		C	T		Аллель	Значение	(95% CI)
Хоккей с шайбой	41	86,6	13,4	$\leq 0,05$	T	2,61	1,25–5,45
					C	0,38	0,18–0,80
Теннис	29	98,3	1,7		T	0,30	0,04–2,21
					C	3,38	0,45–25,25
Хоккей на траве	46	93,5	6,5		T	1,18	0,48–2,91
					C	0,85	0,34–2,10

Продолжение табл. 1

Группы видов спорта	N	Аллели гена, %		P	OR		
		C	T		Аллель	Значение	(95% CI)
Футбол	20	92,5	7,5		T	1,37	0,40–4,69
					C	0,73	0,21–2,51
Академическая гребля	34	86,8	13,2	≤0,05	T	2,57	1,17–5,68
					C	0,39	0,18–0,86
Биатлон	18	97,2	2,8		T	0,48	0,06–3,64
					C	2,08	0,27–15,67
Конькобежный спорт	14	96,4	3,6		T	0,62	0,08–4,75
					C	1,60	0,21–12,18
Плавание	13	100	0,0		T	0,31	0,02–5,27
					C	3,19	0,19–53,63
Велоспорт	13	96,2	3,8		T	0,67	0,09–5,15
					C	1,48	0,19–11,31
Современное пятиборье	17	100	0,0		T	0,24	0,01–4,02
					C	4,15	0,25–69,41
Тяжелая атлетика	17	97,1	2,9		T	0,51	0,07–3,87
					C	1,96	0,26–14,80
Спортивная акробатика	11	90,9	9,1		T	1,69	0,38–7,56
					C	0,59	0,13–2,66
Метания	9	94,4	5,6		T	0,99	0,13–7,71
					C	1,01	0,13–7,83
Стрельба из лука	10	95	5,0		T	0,89	0,11–6,86
					C	1,13	0,15–8,70
Контрольная группа	268	94,4	5,6		–		

Биатлон, плавание, велоспорт, пятиборье, конькобежный спорт относятся к группе видов спорта, характеризующихся сравнительно длительной физической нагрузкой с преимущественно аэробным энергообеспечением. Хоккей с шайбой, хоккей на траве, футбол, большой теннис и академическая гребля – к группе видов спорта, характеризующихся взрывной, короткой по времени и очень интенсивной физической деятельностью. Энергообеспечение спортсменов в этих видах спорта осуществляется преимущественно за счет анаэробных источников с образованием лактата (за счет гликолиза). Тяжелая атлетика, спортивная акробатика, стрельба из лука и метание входят в группу видов спорта, энергетическое обеспечение которых преимущественно анаэробное, без образования лактата (за счет креатинфосфата) [9].

Нами показано, что сумма частот генотипов *CT+TT* гена *HIF1A* в группе спортсменов видов спорта с преимущественным аэробным энергообеспечением была достоверно ниже по сравнению с контролем (4,0% против 10,8% в контроле; $P \leq 0,05$) и значимо выше в группе спортсменов с анаэробным лактатным энергообеспечением (16,5% против 10,8%; $P \leq 0,05$). В то же время, частота встречаемости генотипов *CT+TT* в группе спортсменов с анаэробным алактатным энергообеспечением не отличалась от аналогичного показателя в контрольной группе (табл. 2).

Преимущественный спортивный отбор носителей *T* аллеля в видах спорта с анаэробным лактатным энергообеспечением можно объяснить тем, что данный аллель ассоциируется с повышенной экспрессией транскрипционного фактора *HIF1A*, а следовательно, связан с ингибиро-

ванием цикла Кребса, увеличением экспрессии генов транспортеров глюкозы и гликолитических ферментов, в результате чего происходит сдвиг в сторону анаэробного обеспечения мышечной деятельности за счет гликолиза. Переключение на анаэробный обмен приводит к не-

экономной работе организма, снижается общая работоспособность спортсмена и вероятность достижения высоких спортивных результатов в видах спорта, требующих выносливости, но в то же время такое переключение является преимуществом в скоростно-силовых видах спорта.

Таблица 2

Распределение частот полиморфных вариантов гена *HIF1A* в контрольной выборке и группах спортсменов с различным типом энергообеспечения

Группы видов спорта	N	ЧВ аллеля, %		P	OR		
		CC	CT+TT		Аллель	Значение	(95% CI)
Виды спорта с преимущественно аэробным энергообеспечением	75	96,0	4,0	≤0,05	T	0,34	0,10–1,14
					C	2,91	0,87–9,65
Виды спорта с анаэробным энергообеспечением с образованием лактата	170	83,5	16,5	≤0,05	T	1,57	0,93–2,66
					C	0,64	0,38–1,08
Виды спорта с анаэробным энергообеспечением без образования лактата	47	89,4	10,6		T	0,98	0,36–2,68
					C	1,02	0,37–2,78
Контроль	268	89,2	10,8		–	–	–

Аналогичные результаты получили польские исследователи, которые также установили более высокие частоты встречаемости генотипа *CT* и аллеля *T* гена *HIF1A* в группе спортсменов скоростно-силовой ориентации по сравнению с контролем [10]. Полученные нами данные также вполне согласуются с исследованиями, в которых установлено, что носители генотипа *CT* гена *HIF1A* имеют значительно больший процент быстро сокращающихся гликолитических мышечных волокон, чем носители генотипа *CC* [11].

При сравнении частот встречаемости редких генотипов *CT* и *TT* исследуемого гена *HIF1A* у спортсменов разной квалификации не было выявлено ни одного носителя аллеля *T* среди кандидатов в мастера спорта (КМС). В группах спортсменов с более высокой квалификацией частота встречаемости генотипов *CT+TT* была выше и составляла соответственно 4,1% – для мастеров спорта (МС), 10,0% – для заслуженных мастеров спорта (ЗМС) и 13,6% – для мастеров спорта международного класса (МСМК). Статистически значимые различия в частотах встречаемости генотипов *CT+TT* бы-

ли обнаружены между группами спортсменов с квалификацией МС и МСМК (4,1% против 13,6% соответственно ($P \leq 0,05$)) (рис. 1.), в то время как для МС и ЗМС различия были статистически недостоверны, что можно объяснить малым количеством атлетов в группе ЗМС.

В то же время устойчивость к физическим нагрузкам зависит не только от наличия тех или иных вариантов генов, но и от уровня их экспрессии, индивидуального для каждого человека.

Для подтверждения предположения о том, что наличие полиморфизма *C1772T* в последовательности гена *HIF1A* может влиять на уровень его экспрессии, нами был проведен эксперимент по определению относительного количества копий мРНК исследуемого гена *HIF1A* в группе из 33 человек. Выявлены различия в активности гена *HIF1A* между лицами с генотипами *CC* и *CT+TT*. Среднее значение уровня экспрессии гена *HIF1A* для носителей генотипа *CC* (22 человека) составило $1,98 \pm 0,33$ условных единиц, для носителей генотипов *CT+TT* (11 человек) – $2,75 \pm 0,56$ единиц.

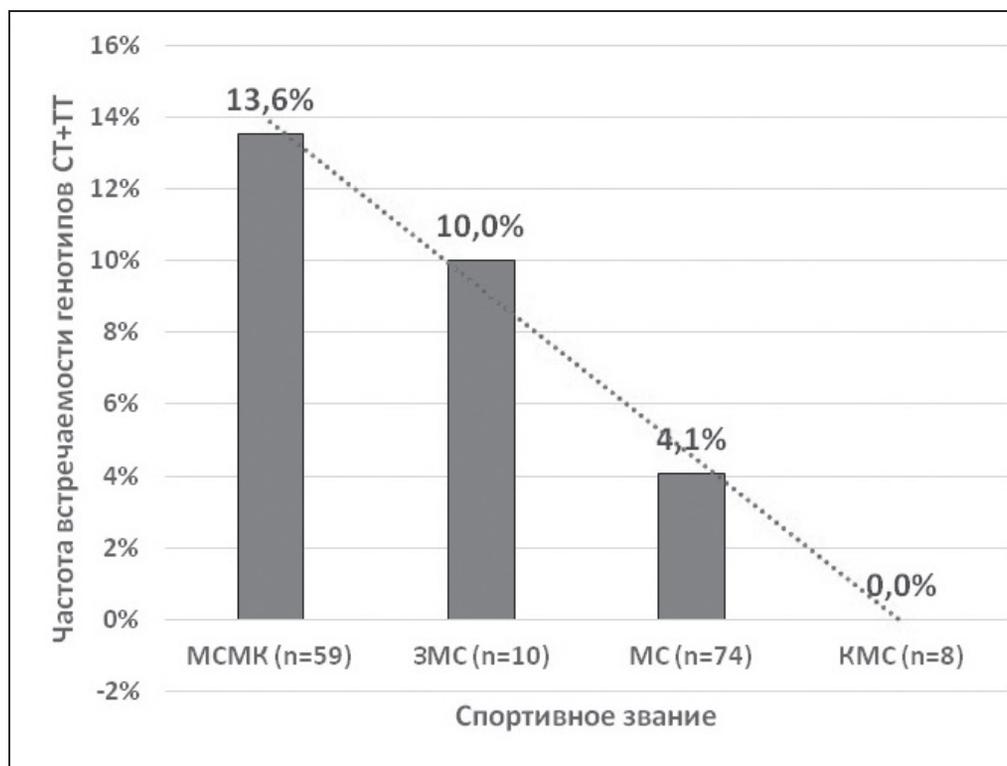


Рис. 1. Частоты встречаемости генотипов *CT+TT* гена *HIF1A* в группах спортсменов с различной квалификацией

При анализе активности гена *HIF1A* до и после выполнения физической нагрузки в группе из 9 легкоатлетов (рис. 2), были показаны значительные индивидуальные различия в изменениях экспрессии гена *HIF1A* у спортсменов с одинаковыми аллельными вариантами гена. При сходном начальном уровне активности гена у одних атлетов отмечали увеличение количества транскриптов гена *HIF1A* после нагрузки, у других наблюдали незначительное изменение либо даже снижение активности в два раза, что предположительно может быть связано с различной эффективностью адаптации спортсмена к физическим нагрузкам.

Для оценки влияния полиморфизма *C1772T* на физическую работоспособность была проведена многофакторная экспресс-диагностика (система Д-Тест [1]) состояния основных источников энергообеспечения мышечной деятельности спортсменов академической гребли (табл. 3). У одного из 30 обследованных атлетов был обнаружен редкий аллель *T* в гомозиготном и у 5 человек в гетерозиготном состоянии. Стоит отметить, что значения определенных функциональных показателей у спортсменов-носителей генотипов *CC*

и *CT* отличаются от таковых у спортсмена с генотипом *TT*. Для последнего характерны низкие значения емкости легких и максимального потребления кислорода (МПК), высокая концентрация лактата, высокие значения частоты сердечных сокращений на пороге анаэробного обмена (ЧСС ПАНУ/мин) и при максимальном потреблении кислорода (ЧСС МПК/мин.), что отражает меньшую адаптацию организма к физическим нагрузкам по сравнению с носителями генотипов *CC* и *CT* [1].

Кроме того, для носителя генотипа *TT* отмечалась более низкая метаболическая мощность физической работы на пороге анаэробного обмена (ИПАНО). Как известно, данный показатель коррелирует с физической работоспособностью и является весьма информативным критерием экономичности кислородных механизмов биоэнергетики [1]. Полученные результаты функциональных тестов, диагностирующих состояние основных источников энергообеспечения мышечной деятельности спортсменов, являются весьма интересными, не противоречат существующим литературным данным [12] и требуют проведения дополнительных исследований.

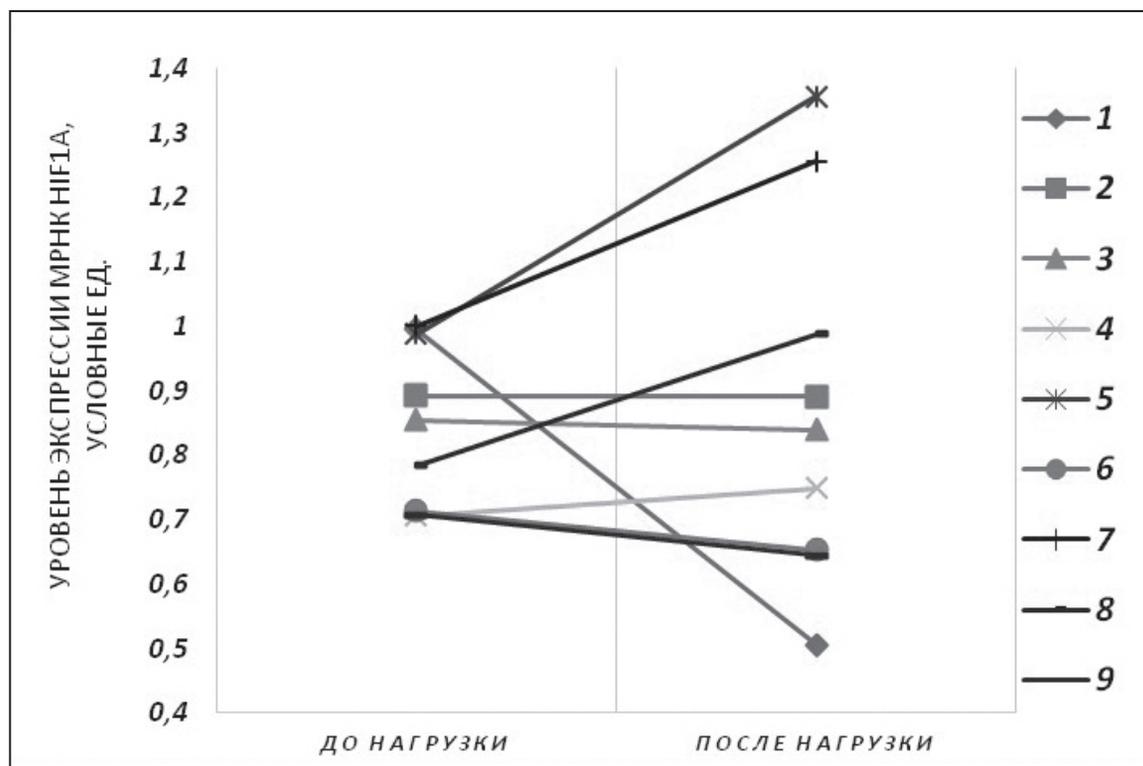


Рис. 2. Уровни экспрессии гена *HIF1A* в группе из 9 легкоатлетов до и после выполнения физической нагрузки

Таблица 3

Результаты теста общей работоспособности спортсменов академической гребли (система Д-Тест)

Группа спортсменов с генотипом	Количество человек	Спирометрия	АГЛМ, %	МПК, %	W ПАНО/%	ЧСС ПАНО/мин	ЧСС МПК/мин	Лактат
СС	24	5655 ± 207	34,7 ± 0,8	56,1 ± 1,1	57,8 ± 0,9	142,0 ± 1,5	154,8 ± 1,7	11,6 ± 0,3
СТ	5	5940 ± 520	33,6 ± 1,6	55,9 ± 0,8	59,4 ± 1,1	141,6 ± 2,5	154,9 ± 2,8	11,2 ± 0,5
ТТ	1	4750	50,2	52,0	48,5	146,0	159,1	16,7

Заключение

Выявлено существование достоверных различий в частотах встречаемости вариантов гена *HIF1A* в группах спортсменов разной специализации. По сравнению с контролем сумма частот генотипов *СТ+ТТ* гена *HIF1A* достоверно ниже в группе спортсменов видов спорта с преимущественным аэробным энергообеспечением (4,0% против 10,8% в контроле; $P \leq 0,05$) и значимо выше в группе спортсменов видов спорта с анаэробным лактатным энергообеспечением (16,5% против 10,8% в контроле; $P \leq 0,05$).

Кроме того, установлена закономерность, что в группе более квалифицированных спортсменов частота встречаемости генотипов *СТ+ТТ* достоверно выше по сравнению с менее квалифицированными.

Обнаружены отличия в экспрессии гена *HIF1A* для носителей генотипов *СТ* и *ТТ* по сравнению с носителями генотипа *СС*. Показаны значительные индивидуальные различия уровней экспрессии гена *HIF1A* у атлетов с одинаковыми аллельными вариантами гена,

что предположительно связано с различной эффективностью тренировочной программы и процессов восстановления после физических нагрузок для разных спортсменов.

Полученные результаты позволяют сделать

вывод, о том, что полиморфные аллели гена *HIF1A* связаны с работоспособностью и спортивной успешностью атлетов и могут быть использованы для оценки функционального потенциала квалифицированных спортсменов.

Список использованных источников

1. Система многофакторной экспресс-диагностики функциональной подготовленности спортсменов при текущем и оперативном врачебно-педагогическом контроле: методические рекомендации / С.А. Душанин [и др.]; под ред. Г.В. Яновского. – Киев: Киевский НИИ медицинских проблем физической культуры МЗ УССР, 1986. – 19 с.
2. Анализ работы учреждений спортивной медицины отрасли физической культуры и спорта Республики Беларусь за 2012 год [Электронный ресурс] / Республиканский центр спортивной медицины. – 2012. – Режим доступа: <http://www.sportmed.altolan.com/files/Analiz.doc>. – Дата доступа: 01.07.2013
3. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2004 update / B. Wolfarth [et al.] // *Med. Sci. Sports Ex.* – 2005. – Vol. 37(6). – P. 881–903.
4. Genes and elite athletes: a roadmap for future research / N. Eynon [et al.] // *J. Physiol.* – 2011. – Vol. 589 (13). – P. 3063–3070.
5. Semenza, G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation / G.L. Semenza, G.L. Wang // *Mol. Cell. Biol.* – 1992. – Vol. 12. – P. 5447–5454.
6. Koh, Y.M. *HIF-1* regulation: not so easy come, easy go / Y.M. Koh, T.R. Spivak-Kroizman, G. Powis // *Trends Biochem Sci.* – 2008. – Vol. 33(11). – P. 526–534.
7. Pfaffi, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M.W. Pfaffi // *Nucleic Acids Research.* – 2001. – Vol. 29 (9). – P. 2002–2007.
8. Байковский, Ю.В. Основы спортивной тренировки в горных видах спорта / Ю.В. Байковский. – М.: Цитадель, 2006. – 251 с.
9. Фармакология спорта / Н.А. Горчакова [и др.]; под общ ред. С.А. Олейника, Л.М. Гуниной, Р.Д. Сейфуллы. – К.: Олимп. л-ра, 2010. – 640 с.
10. The *HIF1A* gene Pro582Ser polymorphism in polish power-orientated athletes / P. Cięszczyk [et al.] // *Biol. Sport.* – 2011. – Vol. 28. – P. 111–114.
11. The combined impact of metabolic gene polymorphisms on elite endurance athlete status and related phenotypes / I.I. Ahmetov [et al.] // *Hum. Genet.* – 2009. – Vol. 6. – P. 751–761.
12. Sequence variation in hypoxia-inducible factor 1alpha (*HIF1A*): association with maximal oxygen consumption / S.J. Prior [et al.] // *Physiol Genomics.* – 2003. – Vol. 15(1). – P. 20–26.

Дата поступления статьи 29 июля 2013 г.

СТРУКТУРА ГЕНОФОНДОВ НАСЕЛЕНИЯ ДВУХ РЕГИОНОВ БЕЛОРУССКОГО ПОЛЕСЬЯ ПО МАРКЕРАМ Y-ХРОМОСОМЫ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

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

Введение

Население белорусского Полесья, особенно его западной части (Брестско-Пинского Полесья) характеризуется рядом лингвистических и этнографических особенностей, чем объясняется повышенный интерес к его изучению со стороны ученых соответствующих специальностей. Больше всего внимания уделялось особенностям полесских говоров [1]. Говоры Полесья сочетают черты как белорусского, так и украинского языков, но при этом отличаются от обоих. Интересной отличительной особенностью полесских говоров является наличие в них архаичных черт и свойств, сближающих их с южнославянскими языками [1, 2]. Стоит также отметить, что в пределах белорусского Полесья выделяются различные говоры и, соответственно, эта территория не является лингвистически однородной [1]. Относительно причин культурной самобытности населения Полесья и его языкового сходства с южнославянскими этносами существуют различные гипотезы. Согласно одной из них, белорусское Полесье входит в состав обширной территории от Одера до современного Курска и от верховьев Немана до севера Карпат, рассматриваемой как прародина славян [3], а население некоторых регионов Полесья, возможно в силу изоляции, сохранило архаичные лингвистические черты. Существует альтернативная точка зрения [2], по которой прародина славян располагалась в

междуречье Вислы и Одера, откуда в примерно одно время произошли миграции на Балканский полуостров и на территорию Полесья, чем объясняется языковое сходство этих регионов.

В качестве объекта исследования было выбрано население региона «Вичин» (деревни Вичин, Дворец, Дребск, Рокитно, Кожан-Городок и Цна Лунинецкого района Брестской области), а также региона «Автюки» (деревни Великие и Малые Автюки Калинковичского района Гомельской области). Выбор региона «Вичин» обусловлен тем, что его жители довольно резко выделяются на фоне соседнего населения не только культурными особенностями, но и антропологическими чертами, в связи с чем описываются И.А. Сербовым [4] как отдельная этническая микрогруппа «Вичинские поляне». Есть археологические данные (остатки городища), указывающие на то, что поселения в этом регионе были еще в V веке до н.э. – VIII веке н.э. Население региона «Автюки» характеризуется яркими лингвистическими особенностями [1].

В рамках данной работы была предпринята попытка изучить генетическую структуру населения регионов «Автюки» и «Вичин» по маркерам Y-хромосомы и мтДНК с тем, чтобы на примере этих популяций выявить возможные причины культурной уникальности и гетерогенности Белорусского Полесья.

Материалы и методы

Сбор биологического материала жителей названных регионов проводился на основании их информированного согласия. ДНК выделялась из пятен периферической крови на фильтровальной бумаге либо из клеток буккального эпителия по методу Mathew (1984) [5]. Для получения информации о родителях, бабушках и дедушках участникам исследования предлагалось заполнить соответствующую анкету.

В анализе использовались только образцы ДНК людей, предки которых по прямым мужской и женской линиям происходят из исследуемых регионов. Всего было собрано 27 образцов в регионе «Автюки» и 44 – в регионе «Вичин», однако при анализе Y-хромосомы из «Автюков» были исключены 2 образца, так как в выборке имелись их близкие родственники по мужской линии.

Для определения гаплогрупп Y-хромосомы проводилось типирование биаллельных маркеров методом ПЦР или ПЦР-ПДРФ. Перечень использованных маркеров, а также методы анализа указаны в табл. 1, последовательности праймеров были взяты из работ Кушнеревич и др. [6] и Underhill et al. [7]. В работе использовалась номенклатура, предложенная консорциумом по Y-хромосоме [8]. Для определения гаплогрупп митохондриальной ДНК (мтДНК) ставилась ПЦР контрольного региона (координаты 15807 – 486) с последующим секвенированием гипервариабельного сегмента 1 (ГВС1), а для некоторых образцов – и ГВС2. Кроме анализа контрольного региона для некоторых образцов осуществлялось генотипирование по диагностическим однонуклеотидным полиморфизмам (ОНП) в кодирующем регионе мтДНК методом ПЦР-ПДРФ (список проанализированных ОНП приведен в табл. 2). При этом использовалась номенклатура, пред-

ложенная van Oven и Kayser [9]. Последовательности праймеров взяты из работ Кушнеревич и др. [10] и Brandstaetter et al. [11].

Для оценки генетического разнообразия в популяциях использовался показатель ожидаемой гетерозиготности H_e , $H_e = 1 - \sum p_i^2$, где p_i – частота i -ой гаплогруппы или гаплотипа [12]; при этом использовались данные по частотам всех гаплогрупп или гаплотипов. Для частот основных гаплогрупп были рассчитаны 95-процентные доверительные интервалы $CI = p \pm 1.96 * SE$, где p – частота гаплогруппы, SE – стандартная ошибка доли. Сравнение популяций по частотам всех основных гаплогрупп проводилось методом хи-квадрат. Для сравнения частот отдельных гаплогрупп в разных популяциях использовался показатель OR (отношение шансов) и его 95-процентные доверительные интервалы. Все расчеты проводились в программе *Microsoft Excel*.

Таблица 1

Маркеры, использованные для определения гаплогрупп Y-хромосомы

№	Гаплогруппа	Маркер	Замена	Метод генотипирования (рестриктаза)
1	<i>R1a1*</i>	SRY110831.2	G→A	ПЦР-ПДРФ (<i>DraIII</i>)
2	<i>R1a1a1b1a1</i>	M458	A→G	ПЦР-ПДРФ (<i>NlaIII</i>)
3	<i>R1b1b2</i>	M269	T→C	ПЦР-ПДРФ (<i>BstNI</i>)
4	<i>N1c1</i>	<i>Tat</i>	T→C	ПЦР-ПДРФ (<i>NlaIII</i>)
5	<i>I1</i>	M253	G→C	ПЦР-ПДРФ (<i>HincII</i>)
6	<i>I2a1</i>	P37.2	T→C	ПЦР-ПДРФ (<i>TaaI</i>)
7	<i>E1b1b1</i>	M35	G→C	ПЦР-ПДРФ (<i>BseNI</i>)
8	<i>J</i>	12f2	Делеция	ПЦР

Таблица 2

Однонуклеотидные полиморфизмы в кодирующем регионе, использованные для определения гаплогрупп мтДНК

№	Гаплогруппа	Маркер	Замена	Метод генотипирования (рестриктаза)
1	<i>V</i>	4580	G→A	ПЦР-ПДРФ (<i>NlaIII</i>)
2	<i>H</i>	7028	A→G	ПЦР-ПДРФ (<i>AluI</i>)
3	<i>U</i>	12308	T→C	ПЦР-ПДРФ (<i>HinfI</i>)
4	<i>J</i>	13708	T→C	ПЦР-ПДРФ (<i>MvaI</i>)

Результаты и обсуждение

Анализ Y-хромосомы

Гаплогруппы Y-хромосомы были определены для 44 мужчин-жителей региона «Вичин» и для 25 мужчин из региона «Автюки». У 44 человек из «Вичина» обнаружено 8 различных гаплогрупп Y-хромосомы, из которых основными являются гаплогруппы *R1a1**, *I2a1* и *N1c1*. Среди 25 мужчин из «Автюков» встречаются носители четырех разных гаплогрупп, среди которых доминирует гаплогруппа *R1a1**. В «Вичине» гаплогруппы *R1b1b2*, *E1b1b1* и *J*, а в «Автюках» – *R1a1a1b1a1*, *II* и *I2a2* – представлены одной фамилией и в большинстве случаев одним образцом каждая. Все обнаруженные гаплогруппы являются обычными для населения Восточной Европы.

Исследуемые популяции являются относительно замкнутыми, что, в частности, проявляется в большом количестве однофамильцев, т.е. многие мужчины в выборке являются потенциальными родственниками по мужской линии. Для того чтобы определить, насколько это обстоя-

тельство искажает полученные данные, из выборок были удалены все носители одинаковых фамилий, кроме одного для каждой фамилии. Если среди однофамильцев были носители разных гаплогрупп, то в выборке оставляли по одному образцу от каждой гаплогруппы. Частоты гаплогрупп в исходных выборках и выборках после удаления из них людей с одинаковой фамилией («без однофамильцев») приведены в табл. 3. Для сравнения даны частоты соответствующих гаплогрупп по Беларуси в целом, а также в Западном и Восточном Полесье. Так как исключение однофамильцев практически не изменяет частоты мажорных гаплогрупп (*R1a1**, *I2a1* и *N1c1*), в последующих анализах однофамильцы из выборок не исключались.

Популяция региона «Автюки» характеризуется низким генетическим разнообразием, в то время как генетическое разнообразие региона «Вичин» лишь немногим ниже, чем в Западном и Восточном Полесье и по Беларуси в целом.

Таблица 3

Частоты гаплогрупп Y-хромосомы в исследуемых популяциях

Популяция	Гаплогруппы (обозначены соответствующими маркерами)								He
	<i>SRY110831.2</i> <i>xM458</i>	<i>M458</i>	<i>M269</i>	<i>M253</i>	<i>P37.2</i>	<i>Tat</i>	<i>12f2</i>	Другие	
«Вичин»	0,205	0,068	0,023	0,0	0,409	0,25	0,023	0,023	0,72
«Вичин» без однофамильцев	0,231	0,077	0,026	0,0	0,385	0,231	0,026	0,026	0,74
«Автюки»	0,84	0,04	0,0	0,08	0,04	0,0	0,0	0,0	0,28
«Автюки» без однофамильцев	0,786	0,071	0,0	0,071	0,071	0,0	0,0	0,0	0,37
Западное Полесье	0,347	0,099	0,041	0,083	0,256	0,083	0,041	0,05	0,79
Восточное Полесье	0,188	0,24	0,021	0,042	0,26	0,083	0,063	0,103	0,82
Вся Беларусь	0,361	0,145	0,057	0,05	0,172	0,1	0,039	0,076	0,80

Примечание: для сравнения приведены частоты в Западном и Восточном Полесье, а также в целом по Беларуси [6]. He – ожидаемая гетерозиготность

95-процентные доверительные интервалы частоты гаплогруппы *R1a1** в популяции региона «Автюки» не перекрываются с доверительными интервалами для Восточного и Западного Полесья, что позволяет говорить о

достоверно более высокой частоте этой гаплогруппы в «Автюках» (табл. 4). Доверительные интервалы частот трех основных гаплогрупп в популяции «Вичина» перекрываются с такими в популяции всего Западного Полесья.

Таблица 4

Значения 95-процентного доверительного интервала для частот трех основных гаплогрупп (*R1a1, *I2a1* и *N1c1*) в популяции «Вичина», а также Западного и Восточного Полесья и Беларуси в целом**

Популяция	<i>R1a1*</i>	<i>I2a1</i>	<i>N1c1</i>
«Вичин»	0,086–0,324	0,264–0,554	0,122–0,378
«Автюки»	0,696–0,983	-0,037–0,117	–
Западное Полесье	0,262–0,432	0,178–0,334	0,034–0,132
Восточное Полесье	0,110–0,266	0,172–0,348	0,028–0,138
Беларусь	0,321–0,4	0,141–0,203	0,075–0,125

Для сравнения между собой популяции «Вичина» и Западного Полесья, к которому «Вичин» территориально относится, был использован тест хи-квадрат применительно к табл. 5.

В результате значение P составило 0,0014, т.е. вероятность того, что две рассматриваемые выборки получены из одной генеральной совокупности, крайне мала.

Таблица 5

Число людей с той или иной гаплогруппой в выборках из «Вичин» и Западного Полесья

Гаплогруппа	«Вичин»	Западное Полесье
<i>R1a1*</i>	9	42
<i>I2a1</i>	18	31
<i>N1c1</i>	11	10
Другие	6	38

В целях сравнения популяции «Вичина» и Западного Полесья были также рассчитаны отношения шансов и их доверительные интервалы для частот трех мажорных гаплогрупп (табл. 6). Лишь для гаплогруппы *N1c1* дове-

рительный интервал отношения шансов не включает единицу, что позволяет на основании данного анализа говорить о том, что частота гаплогруппы *N1c1* в «Вичине» достоверно выше, чем в Западном Полесье (при $P = 0,05$).

Таблица 6

Сравнение частот гаплогрупп *R1a1, *I2a1* и *N1c1* между регионом «Вичин» и Западным Полесьем**

Гаплогруппа	<i>OR</i>	Доверительный интервал
<i>R1a1*</i>	0,48	0,21–1,1
<i>I2a1</i>	2,01	0,97–4,16
<i>N1c1</i>	3,7	1,44–9,48

Анализ митохондриальной ДНК

У 27 жителей «Автюков» было обнаружено 18 разных гаплотипов мтДНК, отнесенных к следующим гаплогруппам: *H**, *H1*, *H4*,

H5, *H6*, *U4*, *U5a*, *K1*, *J1*, *HV*, *V7*, *W3*, *X2*, *Y1*. В популяции «Вичина» у 44 человек был обнаружен 31 разный гаплотип, относящийся к гаплогруппам *H**, *H1*, *H2*, *H5*, *H36*, *J1*, *T1*, *T2*,

U3, U4, U5a, U5b, HV0a, V7, G, IIa, NI и *W1* (см. табл. 7). В целом структура исследуемых популяций по мтДНК сходна с таковой для всей Беларуси: наиболее часто встречается гаплогруппа *H*, суммарная частота разных вариантов которой составляет 44% в «Автюках» и 39% в «Вичине» (в среднем по популяции белорусов частота этой гаплогруппы – 37% [10]) и гаплогруппа *U* – 15–16% (по Беларуси – 20,2%). Остальные гаплогруппы встречаются редко (1–3 образца на выборку). В качестве исключения стоит отметить гаплогруппы *J1* и *T2* в регионе «Вичин» – 7 и 5 образцов соответственно, причем первая представлена четырьмя, вторая – тремя разными гаплотипами. Более того, имеются две пары родственных гаплотипов, относящихся к гаплогруппам *J1b* и *T2b* соответственно. Для обеих популяций характерно высокое значение ожидаемой гетерозитности по гаплотипам мтДНК, т.е. высокое генетическое разнообразие.

Для определения связей между исследуемыми популяциями и населением Беларуси в целом был проведен поиск характерных для жителей «Автюков» и «Вичина» гаплотипов по базе сиквенсов ГВС1 292 белорусов. Результаты приведены в таблице 7. Подчеркиванием обозначены гаплотипы, отличающиеся от найденных в базе максимум на 3 замены, жирным шрифтом – гаплотипы, для которых в базе не обнаружено родственных вариантов мтДНК («уникальные» гаплотипы). Варианты, встречающиеся в базе, обозначены обычным шрифтом. Видно, что большая часть пула мтДНК «Автюков» и «Вичина» представлена либо такими же гаплотипами, либо родственными по отношению к гаплотипам, встречающимся в других регионах Беларуси. Всего в обеих популяциях обнаружено 6 уникальных гаплотипов, 4 из которых относятся к редким вариантам гаплогруппы *H*, встречающимся в разных областях Европы.

Таблица 7

Гаплотипы мтДНК у жителей регионов «Автюки» и «Вичин».
Нуклеотидные последовательности приведены в виде отличий от *rCRS*

«Автюки», <i>N</i> = 27, <i>H_e</i> = 0,933				
№	Гаплогруппа	Последовательность ГВС1	Последовательность ГВС2	Число образцов
1	<i>H*</i>	16519C	263G	2
2	<u><i>H1a</i></u>	<u>16162G, 16328T, 16519C</u>	<u>73G, 263G</u>	<u>2</u>
3	<i>H4</i>	16147T, 16169T	195C, 263G	3
4	<u><i>H5</i></u>	<u>16304C, 16362C</u>	<u>263G, 456T</u>	<u>1</u>
5	<i>H5a</i>	16209C	263G, 310.1C²	2
6	<u><i>H5a</i></u>	<u>16209C, 16304C, 16519C</u>	<u>263G, 456T</u>	<u>1</u>
7	<u><i>H6</i></u>	<u>16261T, 16362C, 16482G</u>	<u>239C, 263G, 310.1C²</u>	<u>1</u>
8	<i>HV</i>	16311C, 16519C	263G	2
9	<i>HV</i>	16311C	263G	1
10	<i>U4a</i>	16356C, 16519C	73G, 143A, 195C, 263G	3
11	<i>U5a</i>	16192T, 16224C, 16256C, 16270T, 16291T, 16399G		1
12	<u><i>K1</i></u>	<u>16224C, 16311C, 16362C, 16519C</u>	<u>73G, 152C, 195C, 263G</u>	<u>1</u>
13	<i>J1b</i>	16069T, 16126C, 16145A, 16172C, 16222C, 16261T, 16519C		2
14	<i>J1b</i>	16069T, 16126C, 16145A, 16172C, 16261T		1
15	<i>V7a</i>	16153A, 16298C		1
16	<i>W3</i>	16223T, 16292T, 16519C	73G, 143A, 189G, 194T, 195C, 199C, 204C, 207A, 263G	1

Продолжение табл. 7

«Автюки», $N = 27$, $He = 0,933$				
№	Гаплогруппа	Последовательность ГВС1	Последовательность ГВС2	Число образцов
17	<u>X2b</u>	<u>16182C, 16183C, 16189C, 16223T, 16266T, 16278T</u>	<u>73G, 153G, 195C, 225A, 226C</u>	<u>1</u>
18	<u>Y1</u>	16126C, 16231C, 16266T, 16325C, 16519C		1
«Вичин», $N = 44$, $He = 0,96$				
1	<i>H*</i>	16519C	263G	7
2	H1	16169T, 16355T, 16362C	263G	1
3	<i>H1a</i>	<u>16051G, 16162G, 16172C, 16519C</u>	<u>73G³</u>	<u>1</u>
4	<i>H1b</i>	<u>16080G, 16356C</u>	<u>73G³</u>	<u>1</u>
5	<i>H1b</i>	16189C, 16356C, 16362C	263G	1
6	<i>H2a1</i>	16354T		2
7	<i>H2a2b</i>	16235G, 16291T		1
8	<i>H5</i>	<u>16192T, 16220C, 16304C, 16311C</u>	<u>263G, 456T</u>	<u>1</u>
9	H5h	16235G, 16304C	263G, 456T	1
10	<i>H36</i>	16070G	152C, 263G, 456T	1
11	<i>HV0a</i>	<u>16169T, 16298C</u>	<u>72C³</u>	<u>1</u>
12	<i>V7a</i>	<u>16092C, 16153A, 16298C</u>	<u>72C, 93G, 263G</u>	<u>1</u>
13	<i>U3</i>	16343G	73G ³	1
14	<i>U4a</i>	16223T, 16356C, 16519C	73G ³	1
15	<i>U5a</i>	16192T, 16256T, 16270T, 16526A	73G ³	1
16	<i>U5a</i>	16114A, 16192T, 16256T, 16270T, 16294T, 16526A	73G ³	1
17	<i>U5b</i>	16144C, 16189C, 16270T		2
18	<i>U5b</i>	<u>16183C, 16189C, 16192T, 16230G, 16270T, 16398A, 16519C</u>		<u>1</u>
19	<i>J1*</i>	16069T, 16126C, 16519C		2
20	<i>J1b</i>	<u>16069T, 16126C, 16145A, 16183C, 16189C</u>		<u>2</u>
21	<i>J1b</i>	<u>16069T, 16126C, 16145A, 16172C, 16222C, 16260T, 16261T, 16519C</u>	<u>73G³</u>	<u>1</u>
22	<i>J1c</i>	<u>16069T, 16126C, 16256T, 16261T</u>	<u>73G, 146C, 185A, 228A, 263G, 295T, 462T</u>	<u>2</u>
23	<i>T1*</i>	<u>16126C, 16163G, 16186T, 16189C, 16294T, 16519C</u>	<u>73G³</u>	<u>1</u>
24	<i>T1a</i>	<u>16126C, 16163G, 16185T, 16186T, 16189C, 16294T, 16519C</u>		<u>1</u>
25	<i>T2b</i>	<u>16126C, 16296T, 16304C, 16311C, 16519C</u>	<u>73G³</u>	<u>2</u>
26	<i>T2b</i>	16126C, 16294T, 16296T, 16304C, 16519C	73G ³	2
27	T2e	16093C, 16126C, 16153A, 16294T, 16318T, 16519C	73G³	1
28	<i>N1b</i>	16145A, 16176A, 16223T, 16390A, 16519C	73G ³	1
29	<i>I1a</i>	16129A, 16172C, 16223T, 16311C, 16319A, 16391A, 16519C		1

Продолжение табл. 7

№	Гаплогруппа	Последовательность ГВС1	Последовательность ГВС2	Число образцов
30	<i>W1</i>	<u>16111T, 16223T, 16292T, 16295T, 16311C, 16519C</u>	<i>73G</i> ³	<u>1</u>
31	<i>G</i>	16093C, 16223T, 16278T, 16362C	73G, 151T, 152C, 263G	1

Примечание: N – объем выборки, He – ожидаемая гетерозиготность; обычным шрифтом отмечены гаплотипы, встречающиеся в выборке белорусов [10], шрифтом с подчеркиванием – гаплотипы, для которых имеются родственные варианты мтДНК (отличающиеся максимум на 3 замены), жирным шрифтом помечены уникальные гаплотипы (в сравнении с пулом мтДНК белорусов).

¹rCRS – revised Cambridge reference sequence, последовательность мтДНК, используемая в качестве последовательности сравнения [13].

²при наличии инсерции 310.1C информация о нуклеотидной последовательности правее этой позиции отсутствует.

³часть нуклеотидной последовательности ГВС2 установлена при секвенировании ГВС1.

Таким образом, выявлены следующие особенности генофонда, характерные для населения обоих изученных регионов: 1) все гаплогруппы Y -хромосомы и подавляющее большинство гаплогрупп мтДНК типичны для Восточной Европы и Беларуси в частности; 2) для обоих регионов характерно более высокое разнообразие по мтДНК нежели по Y -хромосоме, хотя в «Автюках» эта тенденция выражена значительно сильнее, чем в «Вичине»; 3) наблюдается достоверное отличие структуры пулов Y -хромосомы «Автюков» и Восточного Полесья и «Вичина» и Западного Полесья соответственно; 4) многие варианты мтДНК (гаплотипы ГВС1 или субгаплогруппы) распространены и в других регионах Беларуси; 5) наличие в исследуемых популяциях единичных образцов с нетипичными для Восточной Европы гаплогруппами мтДНК *T2e* и *Y*. Гаплогруппа *T2e* встречается с низкой частотой в Европе и более характерна для населения западной Аравии и Османских сефардов [14]. Гаплогруппа *Y* является «дальневосточной» по своему распространению, наиболее часто встречаясь у айнов, ульчей и нивхов [15, 16], но обнаружена также у народов Южной Сибири [17].

Уникальными чертами каждого из регионов являются следующие: для «Автюков» это крайне низкое генетическое разнообразие гаплогрупп Y -хромосомы за счет доминирования гаплогруппы *R1a1**, для «Вичина» – высокие частоты гаплогрупп *I2a2* и *N1c1* при низкой частоте *R1a1** (стоит повторить, что статистическая поддержка получена только для гаплогруппы *N1c1*, причем только по одному из двух тестов).

На основании этих данных можно высказать следующие предположения об истории исследуемых популяций. Для популяции «Автюков» характерен выраженный «эффект основателя» по отцовской линии с последующей изоляцией. На это дополнительно указывает высокий процент однофамильцев: среди 25 человек в выборке лишь 14 разных фамилий. Именно дрейфом наиболее вероятно объясняется высокая частота гаплогруппы *R1a1** и низкие частоты остальных вариантов Y -хромосомы (гаплогруппа *R1a1** широко распространена в Евразии, в частности, в большинстве популяций восточных славян она составляет около 50% пула Y -хромосомы [7]). С другой стороны, сходство пула мтДНК у популяции «Автюков» и других регионов Беларуси и высокое генетическое разнообразие этого компонента генома указывают на то, что по женской линии происходил активный приток генов из прилежащих районов, а в отдельных случаях (например, гаплогруппа *Y*), и из более отдаленных мест. Полученные данные согласуются с представлением о патрилокальности большинства человеческих популяций: жена, как правило, переезжала к мужу, что в целом привело к большей миграционной активности женщин и более равномерному распределению гаплогрупп мтДНК по сравнению с Y -хромосомой [18]. Таким образом, можно высказать следующую гипотезу: деревни Большие и Малые Автюки были основаны относительно небольшим числом семей, после чего притока мужчин практически не происходило, а местные мужчины часто брали себе жен из соседних, а иногда и из более отдаленных населенных пун-

тков. Что касается лингвистических особенностей населения данного региона, можно предположить, что они также являются результатом сочетания дрейфа и последующей изоляции.

Отличие структуры пула *Y*-хромосомы населения «Вичина» от таковой для населения Западного Полесья позволяет предположить, что при формировании современной популяции «Вичина» происходили некие события, повлиявшие на частоты гаплогрупп *Y*-хромосомы. Наиболее вероятно, что такими событиями могли быть либо поток генов из некоей другой популяции, либо сильный дрейф в результате эффекта основателя (если регион «Вичин» был заселен с прилегающей территории Западного Полесья).

Различие частот гаплогруппы *I2a2* между популяциями «Вичина» и Западного Полесья не является достоверным, соответственно, она могла попасть в «Вичин» из других регионов Западного Полесья, при этом не происходило событий, приводящих к сильному генетическому дрейфу. Напомним, что для данной гаплогруппы характерна более высокая частота в Полесье, чем в других частях Беларуси, что предположительно является результатом миграции ее носителей из потенциального балканского ледникового рефугиума на территорию юга современной Беларуси [6, 19]. Таким образом, заселение «Вичина» носителями *Y*-хромосомы *I2a2* произошло либо так же, как и заселение других регионов Западного Полесья (в резуль-

тате миграции с Балкан), либо позже в результате миграции с прилегающих территорий.

Максимальное (и единственное достоверное на основании расчета 95-процентных доверительных интервалов для отношения шансов) различие частот между «Вичином» и Западным Полесьем характерно для гаплогруппы *N1c1*. Она имеет азиатское происхождение и в Европе с максимальной частотой встречается у финно-угорских народов и балтов [20, 21]. В среднем частота этой гаплогруппы у белорусов составляет 10%, на юге она несколько ниже (8,3%), на западе и севере – 12,3% и 14,9% соответственно [6]. Считается, что в генофонд балтов и восточных славян (в том числе и белорусов) она попала от протофинно-угорских кочевников, заселивших территорию Восточной Европы сразу после окончания последнего ледникового максимума около 10–12 тысяч лет назад [22]. Можно предположить, что высокая доля этой гаплогруппы у жителей региона «Вичин» связана с неким демографическим событием, например, с притоком *Y*-хромосом *N1c1* в результате иммиграции из популяции с высокой частотой данной гаплогруппы (например, с территории современных балтийских стран), либо с сохранением более высокой доли древнего населения региона, являвшегося носителем *N1c1*. Для проверки этой, а также других гипотез, необходимо провести анализ генетического разнообразия *Y*-хромосом по *STR*-маркерам.

Заключение

Сравнение структуры генофондов двух популяций Белорусского Полесья и общей популяции белорусов позволяет заключить, что культурная уникальность населения указанных регионов коррелирует с отличиями их генофонда от генофонда белорусов в целом по частотам и генетическому разнообразию гаплогрупп *Y*-хромосомы,

но не мтДНК. Эти результаты могут быть объяснены совместным действием «эффекта основателя» по мужской линии и низким уровнем иммиграции мужчин как следствие патрилокальности. Возможно, дрейф и изоляция являются также причиной лингвистических и других культурных особенностей жителей этих регионов.

Список использованных источников

1. Клімчук, Ф.Д. Гаворкі Заходняга Полесся: Фанетычны нарыс / Ф.Д. Клімчук, АН Беларус. ССР. Ін-т мовазнаўства імя Я.Коласа. – Мінск: Навука і тэхніка, 1983. – 128 с.
2. Мартынов, В.В. Проблема славянского этногенеза и методы лингвогеографического изучения Припятского Полесья / В.В. Мартынов // Советское славяноведение. – 1965. – № 4. – С. 69–81.
3. Клімчук, Ф.Д. Да вытокаў фарміравання ўсходнеславянскіх народаў. / Ф.Д. Клімчук // KRYUJA. Crivica. Baltica. Indogermanica. – 1998. – № 1(3). – С. 100–148.
4. Сербяў, І.А. Вічыньскія паляне. Матэрыяльная культура. Этнаграфічны нарыс Беларускага Полесся / І.А. Сербяў. – Мінск: Беларускі Фонд Культуры, 2005 – 80 с.

5. Mathew, C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA / C.C. Mathew // *Meth. Mol. Biol., Human Press.* – 1984. – Vol. 2. – P. 31–34.
6. Y-chromosome gene pool of Belarusians – clues from biallelic markers study / A. Kushniarevich [et al.] // *Доклады Академии наук Беларуси.* – 2007. – Т. 51, № 5. – С. 100–105.
7. Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a / P.A. Underhill [et al.] // *Eur J Hum Genet.* – 2010. – Vol. 18. – P. 479–484.
8. Y-DNA Haplogroup Tree [Electronic resource] / International Society of Genetic Genealogy. – 2013. – Version 8.64. – Mode of access: <http://www.isogg.org/tree/>. – Date of access: 05.08.2013.
9. Van Oven, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation / M. van Oven, M. Kayser // *Hum Mutat.* – 2009. – Vol. 30, № 2. – P. 386–394.
10. Кушнеревич, Е.И. Разнообразие митохондриальной ДНК современных белорусов / Е.И. Кушнеревич // *Доклады Академии наук Беларуси.* – 2007. – Том 51, № 1. – С. 79–83.
11. Generating population data for the EMPOP database – an overview of the mtDNA sequencing and data evaluation processes considering 273 Austrian control region sequences as example / A. Brandstaetter [et al.] // *Forensic Sci Int.* – 2007. – Vol. 166(2–3). – P. 164–75.
12. Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations / M. Nei // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1973 – Vol. 70(12) – P. 3321–3323.
13. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA / R.M. Andrews [et al.] // *Nat Genet.* – 1999. – Vol. 23(2). – P. 147.
14. Bedford, F.L. Sephardic signature in haplogroup T mitochondrial DNA / F.L. Bedford // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 20. – P. 441–448.
15. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan / M. Tanaka [et al.] // *Genome Res.* – 2004. – Vol. 14(10A) – P. 1832–1850.
16. Mitochondrial DNA diversity in indigenous populations of the southern extent of Siberia, and the origins of Native American haplogroups / E.B. Starikovskaya [et al.] // *Ann. Hum. Genet.* – 2005. – Vol. 69(Pt 1) – P. 67–89.
17. Structure and diversity of the mitochondrial gene pools of south Siberians / M.V. Derenko [et al.] // *Dokl Biol Sci.* – 2003. – Vol. 393 – P. 557–561.
18. Investigating sex-biased migration during the Neolithic transition in Europe, using an explicit spatial simulation framework / R. Rasteiro [et al.] // *Proc Biol Sci.* – 2012. – Vol. 279 (1737). – P. 2409–2416.
19. Phylogeography of Y-Chromosome Haplogroup I Reveals Distinct Domains of Prehistoric Gene Flow in Europe / S. Rootsi [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2004 – Vol. 75 – P. 128–137.
20. Y-chromosome haplogroup N dispersals from south Siberia to Europe / M. Derenko [et al.] // *J Hum Genet.* – 2007. – Vol. 52(9) – P. 763–770.
21. Migration waves to the Baltic Sea region / T. Lappalainen [et al.] // *Ann Hum Genet.* – 2008. – Vol. 72 (Pt 3). – P. 337–348.
22. Давыденко, О. Гаплогруппы Y-хромосомы и происхождение национального генофонда / О. Давыденко, Е. Кушнеревич // *Наука и инновация.* – 2011. – № 9(103). – С. 12–15.

Дата поступления статьи 13 августа 2013 г.

ОБОСНОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ МОДЕЛИ СОРТА ЛЬНА МАСЛИЧНОГО ДЛЯ УСЛОВИЙ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

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

²УО «Белорусский государственный технологический университет»,

Республика Беларусь, 220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а

³ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,

Республика Беларусь 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

Введение

Лен масличный – источник ценного масла, белка и биологически активных добавок к пище. Культура масличного льна наиболее распространена в районах с теплым и сухим климатом (страны Азии, Америки), однако в условиях умеренно-континентального климата Беларуси лен может являться сравнительно надежной среднеурожайной масличной культурой, дающей ценное масло [1]. Новые технологии переработки семян и льняной соломы существенно расширили сферу промышленного и пищевого использования льна, поэтому в настоящий момент актуально выращивание сортов, помимо высокой продуктивности характеризующихся сбалансированным химическим составом семян и оптимальной концентрацией активных компонентов [2].

Понятие о сортовом идеале впервые было введено Н.И. Вавиловым в 1935 году [3]. При лучшем сочетании всех хозяйственно-важных признаков идеальный сорт (идеотип) способен давать предельный теоретически возможный урожай в биоклиматических условиях зоны выращивания. Это, по существу, лучший идеальный вариант сорта, перспективная цель селекции [3]. Рядом авторов были рассмотрены селекционные, анатомо-физиологические, биохимические аспекты [4–6] и принципы [7] создания моделей со-

ртов и их практической реализации. Реализация наследственных возможностей генотипа определяется его приспособленностью к условиям окружающей среды [8], однако совмещение высокого потенциала продуктивности с широкой экологической пластичностью является крайне сложной селекционной задачей, поэтому модели сортов разрабатывают для каждой агроклиматической зоны возделывания [9]. При создании сорта учитывают особенности всех признаков и свойств растения, необходимые для получения сорта с заданными параметрами, а также возможности конструирования новых генотипов [10].

Параметры оптимальной модели сорта льна масличного для условий РБ разработаны с учетом литературных данных по мировым коллекциям ВИР [11, 12] и PGRC [13, 14] и результатов изучения характера проявления хозяйственно-ценных признаков льна масличного в условиях Беларуси. Модель включает: 1) характеристику погодно-климатических условий Беларуси с доказательством реальности планируемого уровня достижения хозяйственно-ценных признаков; 2) описание 17 селекционно-значимых признаков, с учетом генетической изменчивости существующих сортов льна; 3) указание на генотипы источники (доноры) важнейших признаков, если они есть.

Материалы и методы

Материалом для проведения исследований послужили 26 сортообразцов генетической коллекции льна Института генетики и цитологии НАН Беларуси: Antares, Mivast, Atalante (Франция); Blue Chip (Венгрия); Glenelg (Австралия); Deep Pink (Нидерланды); Linota, SU-1-10, Omega, (США); K 5827 (Уругвай); Gold Flax,

McGregor, Somme, Л-6582, К-6570, Flanders (Канада); Raluca, Sandra (Чехия); Cyan (Польша); К-2398 (Китай); Воронежский, К-5627, К-5621, Небесный, (РФ); ЛМ-1, ЛМ-2, (Беларусь, селекция Л.М. Полонецкой). В качестве стандартов были использованы сорта Ручеек (РФ) и Lirina (Германия), районированные в Беларуси.

Территория Беларуси находится в умеренном поясе на пути западных воздушных масс из Атлантики, чем обусловлен умеренно континентальный климат республики. К неблагоприятным агроклиматическим факторам региона относятся: неустойчивый характер погоды весной и осенью, мягкая с продолжительными оттепелями зима, дождливое лето с нехваткой влаги в его начале, поздние весенние и ранние осенние заморозки [15].

В пределах Беларуси выделяют 3 агроклиматические зоны и 19 районов. В зависимости от региона сумма активных температур составляет 2000–2600 °С, период активной вегетации растений 180–208 д. [16]. Беларусь относится к среднеувлажненным районам, однако осадки выпадают неравномерно и количество их колеблется от 550–600 мм на юге и юго-западе до 600–650 мм в центральных и северо-восточных районах и до 700 мм на возвышенностях. Около 2/3 осадков выпадает в теплый период года.

Исходя из невысоких требований льна масличного к влаге, его транспирационный коэф-

фициент равен 400, наиболее благоприятны для выращивания южные регионы республики, характеризующиеся высокой суммой активных температур и более низким количеством выпадающих осадков [16]. Благоприятные для прорастания семян льна условия (среднесуточной температуры почвы на глубине 5–10 см +7–8 °С и влажность 50–60 % от полной влагоемкости) наблюдаются в республике уже в первой декаде мая, необходимая для полного развития растений льна масличного сумма активных температур в 1600–1850 °С достигается в течение 80–110 дней. В зависимости от длины вегетационного периода сорта, уборку льна масличного осуществляют в августе-начале сентября [17]. Высокая кислотность почвенного раствора (рН≈5,0), характерная для большинства почв республики, препятствует развитию кальциевого хлороза (при рН выше 6,0). Однако внесение извести повышает урожай и увеличивает выход масла. При достаточном обеспечении известью особое внимание уделяют калийным и магниевым удобрениям.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований (2005–2009 гг.) коллекции сортообразцов льна масличного по признакам продуктивности и биохимического состава семян приведены в табл. 1.

Анализ таблицы использован при выборе доноров хозяйственно-ценных признаков и обоснования оптимальных параметров модели сорта льна масличного для условий Республики Беларусь (табл. 2).

Продолжительность вегетационного периода. Масличные формы льна теплолюбивы, полный цикл развития занимает 80–110 дней, для раннеспелых сортов льна – 72–76 дней, среднеспелых – 77–86 дней, позднеспелых – 87–95 дней [18]. По многолетним данным при выращивании в условиях Беларуси сорта льна масличного проявляют себя как средне- и позднеспелые формы. Длина вегетационного периода сорта-стандарта Ручеек составляет 83 дня, сорта Lirina – 95 дней. В модель заложена перспектива создания максимально раннеспелого сорта, так как сокращение вегетационного периода позволит снизить потери урожая в результате ранних осенних заморозков, повреждения коробочек птицами, грибами и ветром. Наиболее раннеспелые

в условиях Беларуси сорта Mivast, K-5827, DeepPink, Linota.

Техническая длина стебля. Согласно европейскому стандарту, высота растений для возделывания льна на семена составляет 50,0–55,0 см, при двойном использовании на семена и волокно – 75,0 см и выше [19]. Между технической длиной растения и семенной продуктивностью выявлена отрицательная корреляционная зависимость [20], что указывает на необходимость привлечения в скрещивания сортообразцов льна с технической длиной стебля, не превышающей 40,0–45,0 см. Донорами признака низкой технической длины могут являться сорта Mivast, Antares, K-5627, K-6570, Flanders.

Урожайность. Потенциальная урожайность сортов для Беларуси должна составлять не менее 12,0 ц/га. Включенные в госреестр сорта льна масличного Ручеек, Lirina, Брестский в отдельные благоприятные годы дают до 16,0 ц/га и больше [21]. При повышении устойчивости к стрессовым факторам среды новые сорта льна масличного должны стабильно обеспечить такую урожайность семян. Высокая урожайность семян обеспечивается такими признаками как число коробочек с растения,

Таблица 1
Описание коллекции сортов образцов льна масличного (средние значения признаков 2005–2009 гг.)

№	Сорт	ПВП	ТД	КР	СР	СК	МСР	М1000	Масло	Белок	АЛК	ЙЧ	РО ₄	Фитин	РП	Зола	К
1	Antares	100	38,96	10,90	86,00	7,88	0,62	7,18	41,56	20,64	53,57	178,75	2,16	33,15	16,00	4,81	23,93
2	Atalante	101	44,34	10,95	90,22	7,72	0,52	5,83	41,29	19,99	51,25	173,62	2,68	33,96	14,00	4,49	23,25
3	BlueChip	86	43,45	10,32	72,96	6,99	0,51	7,12	42,85	21,38	51,73	171,78	2,38	35,40	14,33	4,85	20,53
4	DeepPink	86	50,80	9,88	80,58	8,22	0,44	5,5	40,70	21,31	48,49	168,22	2,06	33,80	12,67	4,86	20,39
5	Flanders	105	38,77	13,64	111,05	8,11	0,61	5,41	42,11	20,35	52,51	171,65	2,10	35,76	22,00	4,39	22,54
6	Gleneig	87	46,02	10,53	80,24	7,84	0,57	7,00	40,16	20,76	47,39	172,41	2,22	33,49	14,67	4,73	21,07
7	Gold Flax	110	45,52	12,10	100,31	8,32	0,61	6,15	44,10	22,45	1,45	133,10	2,09	31,85	8,67	4,07	21,89
8	Linota	86	49,52	10,21	83,64	8,06	0,49	5,82	40,48	21,44	47,44	168,57	1,61	29,73	13,67	4,81	20,75
9	McGregor	91	46,96	12,69	102,76	8,08	0,61	5,94	42,72	20,16	48,91	169,61	2,23	32,91	12,67	3,93	19,84
10	Mivast	84	31,91	9,00	63,71	7,16	0,45	7,13	43,35	21,97	46,99	170,01	1,79	32,92	10,67	4,39	25,61
11	Omega	101	43,99	11,36	85,80	7,43	0,56	6,56	43,88	21,38	47,21	170,79	2,26	32,92	13,00	4,42	21,86
12	Raluca	97	44,55	10,37	81,16	7,79	0,56	6,98	42,38	20,66	49,90	172,72	1,95	31,73	15,67	4,67	22,22
13	Sandra	101	38,71	10,49	86,44	8,17	0,58	6,73	42,50	21,40	49,11	172,04	2,19	33,45	9,67	4,72	22,87
14	Somme	100	44,25	12,87	104,9	7,76	0,64	6,03	42,72	21,27	51,37	172,24	2,47	35,14	11,00	4,28	25,06
15	SU-1-10	97	43,15	11,42	90,82	7,88	0,51	5,54	42,52	21,07	50,10	159,55	2,12	33,37	8,67	4,21	22,99
16	Воронежский	101	44,48	11,03	89,24	8,06	0,52	5,80	39,96	21,48	48,08	172,76	1,69	32,81	6,00	4,14	22,52
17	К-2398	86	42,32	13,64	99,12	7,14	0,55	5,39	39,68	21,64	50,93	175,40	1,79	32,34	11,00	4,45	19,80
18	К-5627	86	36,88	10,05	78,25	7,87	0,57	7,07	46,47	20,02	51,40	182,09	1,89	34,47	11,67	4,70	21,93
19	К-5827	85	42,12	13,77	101,60	7,46	0,58	5,86	44,28	20,49	50,91	172,87	2,14	30,68	15,33	4,52	20,78
20	К-6570	86	37,84	10,52	79,20	7,57	0,44	5,92	41,16	21,11	46,72	169,61	2,03	33,33	15,67	4,28	23,09
21	Л-6582	88	46,9	11,78	89,10	7,64	0,52	5,99	41,37	21,34	46,29	167,89	1,99	34,40	13,67	4,44	22,07
22	ЛМ-1	90	42,97	10,03	81,84	8,02	0,62	7,57	46,08	21,26	52,18	180,75	1,68	32,14	10,33	4,54	24,30
23	ЛМ-2	93	42,35	10,81	88,66	8,19	0,66	7,27	46,72	21,28	49,89	175,05	2,07	33,17	11,67	3,84	28,74
24	Небесный	101	46,78	11,97	85,32	7,17	0,61	7,17	47,67	20,50	51,55	182,50	1,74	33,33	8,67	4,37	23,33
25	Циан	86	38,60	10,44	76,97	7,33	0,52	6,67	45,84	19,74	51,58	177,15	1,64	32,03	10,33	4,10	23,08
НСР _{0,05}		1,10	9,57	3,50	28,86	0,94	0,20	0,40	0,50	3,73	5,25*	9,37*	6,70	3,20	3,48	0,65	–

Примечание: ПВП – продолжительность вегетационного периода, сут; ТД – техническая длина стебля, см; КР – коробочек с растения, шт; СР – семян с растения, шт; МСР – масса семян с растения, г; М 1000 – масса тысячи семян, г; Масло – содержание масла, %; Белок – содержание белка, %; АЛК – содержание α-линоленовой кислоты, %; ЙЧ – йодное число масла, ед; РО₄ – содержание неорганических фосфатов, мг/г; Фитин – содержание солей фитиновой кислоты, мг/г; РП – содержание растворимых полисахаридов, %; Зола – зольность, %; К – содержание калия, мг/г. * – НСР_{0,05} рассчитано без учета сорта Gold Flax.

Таблица 2

Параметры модели сорта льна масличного для условий Республики Беларусь

№	Признак	Сорт Ручеек	Сорт Lirina	Модель сорта
1	Вегетационный период, сутки	80,0–83,0	100,0	80,0–87,0
2	Техническая длина, см	42,0	45,0	40,0–45,0
3	Урожайность семян, ц/га	11,9	11,8	15,0–17,0
4	Количество коробочек с растения, шт.	15,0	12,0	15,0–20,0
5	Количество семян с растения, шт.	116,0	95,0	115,0–130,0
6	Количество семян в коробочке, шт.	8,0	8,0	8,0–9,0
7	Масса семян с растения, г	0,6	0,5	0,6–0,8
8	Масса 1000 семян, г	5,5	5,3	5,5–7,5
9	Масличность семян, %	47,4	48,9	>49,0
10	Йодное число масла, ед.	167,6	158,1	180,0–185,0
11	АЛК (α -линоленовая кислота), %	45,8	43,7	45,0–47,0
12	Содержание белка, %	20,9	22,3	19,5–20,0
13	Содержание растворимых полисахаридов, %	10,0	9,3	10,0–12,0
14	Содержание фитина, мг/г	32,7	38,3	30,0–32,0
15	Содержание $P_{неор}$, мг/г	1,9	2,1	3,0–3,5
16	Зольность, %	3,6	4,1	4,0–4,5
17	Содержание К, мг/г	23,5	25,9	>22,0
18	Секоизолацирезинол дигликозид, мг/г обезжиренной фракции	11,0	12,2	>12,2

число семян с растения, масса семян с растения. Стабильно высокой урожайностью в условиях Беларуси характеризуются образцы BlueChip, ЛМ-1, ЛМ-2, Flanders, Небесный, Somme.

Масса 1000 семян. Современные сорта, возделываемые в производстве, имеют массу 1000 семян 5,5–8,0 г. Крупные семена свыше 8,0 г имеют преимущество при очистке, в то же время в период налива семян они сильнее подвержены засухе, что приводит к невыполненности. Наиболее оптимальными будут сорта с массой 1000 семян 5,5–7,5 г. В анализируемой коллекции этому требованию соответствуют сорта Antares, BlueChip, K-5627, Mivast, Небесный, селекционные формы ЛМ-1, ЛМ-2.

Масличность. Выход масла с 1 га посевной площади в значительной степени обусловлен масличностью семян и их урожайностью. Средняя масличность семян льна-кудряша достигает 41,0–49,0%, в то время как у семян льна-долгунца всего 37,0–39,0% [22]. Содержание масла зависит от многих факторов: количества

осадков, температурного режима, обеспеченности питательными веществами, особенностями сорта, повреждения болезнями и вредителями. В погодно-климатических условиях РБ идеотип льна масличного должен накапливать не менее 47,0% масла, а в благоприятные годы не менее 49,0%. Высокой концентрацией масла в семенах (48,0–50,0%) характеризуются селекционные образцы ЛМ-1 и ЛМ-2, сорт Небесный.

Содержание белка в семенах льна колеблется от 16,0 до 33,0%, что приближает его к зерну бобовых, и существенно выше по сравнению со злаками (пшеница – 11,0–13,0%) [23]. Высокопротеиновые сорта льна необходимы для производства кормов, каш и выпечки. Однако обратная зависимость содержания масла и белка в семени (коэффициент корреляции $r = -0,5$) диктует необходимость соблюдения баланса между содержанием этих двух компонентов. Исходя из выбранного соотношения накопления масла и белка 2,3:1, при модельной масличности идеотипа (47%) содержание белка в семени должно составлять 19,5–20,0%. Таким

требованиям соответствуют сорта McGregor, K 5627, ЛМ-1, ЛМ-2, Небесный, K 6570.

Содержание α -линоленовой кислоты (АЛК). Отличительной особенностью льняного масла является высокая концентрация (до 55%) АЛК. С помощью современных селекционно-генетических методов созданы формы льна с измененным жирно-кислотным составом, вплоть до снижения концентрации АЛК до 2,0–3,0% (например, новый тип льна – “Solin”) [14]. Для создания сортов льна масличного нутрицевтического назначения донорами высокого содержания АЛК в масле (50,0–55,0%) могут являться сорта Antares, ЛМ-1, Циан, Flanders. Солинные (низколиноленовые) сорта льна Gold Flax, Солнечный, Амон – источники генов низкого накопления АЛК в семени.

Йодное число масла – масса йода (г), присоединяющегося к 100 г органического вещества, характеризует содержание двойных связей и определяет общую ненасыщенность масла [24]. В идеале, значение йодного числа технического льняного масла должно составлять 180,0–185,0 ед., пищевого (с низким содержанием АЛК) \approx 140,0 ед. Общая закономерность созревания семян масличных культур – повышение ЙЧ масла при снижении среднесуточных температур в период созревания позволяет получить высокое качество масла у льна, выращенного в условиях умеренно-континентального климата Беларуси.

Содержание растворимых полисахаридов (РП, слизей или камедей). В состав РП семян льна входят кислые гемицеллюлозы – арабиноксиланы и рамногалактуронаны [13]. В зависимости от сортовых особенностей и степени зрелости семени общее содержание РП подвержено значительным колебаниям (3,0–12,0% от сухого веса). В семенах льна РП выполняют защитную и запасающую функции, участвуют в прорастании. Для организма человека льняные слизи – это смягчающее и обволакивающее средство, ценный пребиотик и детоксикант. Исследования не выявили зависимостей уровня накопления РП от концентрации других важных компонентов льняного семени [13], поэтому, в модели сорта следует установить верхнюю границу известного уровня накопления растворимых полисахаридов в семенах льна – то есть 10,0–12,0%. Высокой концентрацией РП характеризуются семена сортов Flanders и Antares.

Содержание фитина. Фитин (смешанная соль мио-инозитолгексафосфорной кислоты) оказывает два противоположных эффекта, являясь антинутриентом с полезными для здоровья человека физиологическими функциями [25]. Механизмы фосфорного обмена семени обуславливают прямую зависимость концентрации запасного фитина от уровня неорганических фосфатов. Например, в семенах солинного сорта Gold Flax отмечены низкие уровни как фитина (24,6–31,7 мкг/г), так и фосфатов (1,5–1,9 мкг/г). Поэтому при селекции сорта льна пищевого назначения со сниженным содержанием фитина (до 30,0–32,0 мкг/г) и высоким уровнем неорганических фосфатов (3,0–3,5 мкг/г) селекционные усилия должны быть направлены на получение генотипов со сниженным уровнем экспрессии ферментов биосинтеза фитиновой кислоты, при сохранении интенсивности процессов обмена фосфора в семени.

Содержание зольного остатка. Зольность семени – это количество минеральных веществ, содержащихся в нем. Зола содержит все биогенные элементы, поглощенные растением и депонированные в семени, за исключением азота, который улетучивается в процессе горения. Среднее содержание зольных веществ в семени льна составляет 3,5–4,5%, что ниже, чем у семян сои (4,0–7,0%), масличного рапса (6,5–7,0%), подсолнечника (\approx 6,0%), однако в 1,5–2 раза выше, чем у семян злаков [26]. Выбранные для модели значения уровня зольных веществ (4,0–4,5%), отражают стремление к повышению минерального статуса семян льна, в то же время более высокие концентрации зольных элементов нежелательны, так как в семенах льна могут накапливаться тяжелые металлы, особенно кадмий [27].

Содержание калия. В 100 г семян льна содержится 200,0 мг калия. Калий способствует выведению лишней жидкости из организма, благоприятно действует на опорно-двигательную и сердечно-сосудистую системы [28]. Для пищевых и кормовых сортов льна масличного желателен увеличенный уровень концентрации калия (>20,0 мг/г) в семенах, что будет способствовать профилактике заболеваний и увеличению костно-мышечной массы.

Содержание лигнанов. Льняное семя – богатейший источник фенольных соединений лигнанов, содержание которых может достигать

300,0 мг/г. Главные лигнаны льняного семени – секоизолярицирезинол дигликозид (СДГ) и магаирезинол – обладают сильной эстрогенной и антиоксидантной активностью, являются перспективными источниками лекарств и профилактических препаратов [29]. Лигнаны

преимущественно депонируются в семенных оболочках льна [30], в связи с этим крупносемянные сорта (Raluca, Atalante) характеризуются более высокой концентрацией лигнанов. Высокое содержание СДГ 14,4 мг/г отмечено в семенах низколиноленового сорта Gold Flax.

Заключение

В результате проведенных исследований нами предложена модель сорта льна масличного пищевого назначения для селекционной работы в Республике Беларусь. Выбор биохимических и технологических параметров модельного сорта детерминирован лимитирующими факторами условий выращивания, конкурент-

ными взаимосвязями между целевыми признаками и объективными потребностями рынка. Генетический и физиолого-экологический анализ позволил выделить исходный селекционный материал льна масличного, представляющий интерес для почвенно-климатических условий республики.

Список используемых источников

1. Богдан, Т.М. Лен масличный источник растительного масла в Республике Беларусь / Т.М. Богдан, Л.М. Полонецкая // Проблемы и пути повышения эффективности растениеводства в Беларуси: матер. юбил. междунар. науч.-практ. конф., 29 июня 2007 г., г. Жодино / НПЦ НАН Беларуси по земледелию; ред. Ф.И. Привалов [и др.]. – Минск: ИВЦ Минфина, 2007. – С. 114–116.
2. Жученко, А.А. Мобилизация генетических ресурсов льна / А.А. Жученко, Т.А. Рожмина. – Тверь: Старица, 2000. – 224 с.
3. Вавилов, Н.И. Генетика на службе социалистического земледелия / Н.И. Вавилов // Теоретические основы селекции. – Москва, 1987. – С. 142–167.
4. Дзюба, В.А. Разработка теоретической модели идеального сорта риса / В.А. Дзюба // Физиолого-генет. основы повышения продуктивности зерновых культур / В.А. Дзюба – М., 1975. – С. 267–274.
5. Кумаков, В.А. Анализ фотосинтетической деятельности растений и физиологическое обоснование модели сорта / В.А. Кумаков // Фотос-з и продукционный процесс; ред. А.А. Ничипорович. – М., 1988. – С. 247–251.
6. Struik, P.C. An ideotype of forage maize for north-west Europe / P.C. Struik // Netherlands J. of Agr. Sc. – 1984. – Vol. 32. – P. 145–147.
7. Хангильдин, В.В. Системный анализ теории селекции / В.В. Хангильдин // Прикладные аспекты генетики, цитологии и биотехнологии сельскохозяйственных растений: Сб. науч. тр. ВСГИ. / ВАСХНИЛ, Всесоюз. селекц.-генет. ин-т; редкол.: С.В. Бирюков [и др.]. – Одесса, 1988. – С. 78–90.
8. Орлюк, А.П. Физиолого-генетический принцип создания интенсивных сортов озимой пшеницы для орошаемого земледелия / А.П. Орлюк // Применение физиологических методов при оценке селекционного материала и моделирование новых сортов сх. культур: Мат. I Всесоюз. конф.; г. Жодино, 18–19 дек. 1981 г. / ВАСХНИЛ; редкол.: В.С. Шевелуха [и др.]. – М., 1983. – С. 42–47.
9. Унтила, И.П. Основные параметры моделей сортов озимой пшеницы для зоны недостаточного увлажнения / И.П. Унтила, Л.В. Гаина, А.А. Постолатий // Генетика и селекция растений: Мат. V съезда ВОГиС. – М., 1987. – Т. 4, ч. 2. – С. 206–207.
10. Гурьев, Б.П. К разработке генетической модели сортов сельскохозяйственных культур / Б.П. Гурьев, П.П. Литун, Л.В. Бондаренко // Применение физиологических методов при оценке селекционного материала и моделирование новых сортов сельскохозяйственных культур: Мат. I Всесоюз. конф.; г. Жодино, 18–19 дек. 1981 г. / ВАСХНИЛ; редкол.: В.С. Шевелуха [и др.]. – М., 1983. – С. 16–19.
11. Рожмина, Т.А. Национальная коллекция русского льна как источник устойчивости к неблагоприятным агроклиматическим факторам среды / Т.А. Рожмина // АПК: Дост. науки и техники. – 2003. – № 11. – С. 17–18.
12. Брач, Н.Б. Лен / Н.Б. Брач, Е.А. Пороховинова, С.Н. Кутузова // Идентифицированный

- генофонд растений и селекция – СПб.: ВИР, 2005. – С.303–329.
13. Diederichsen, A. Variation of Mucilage in Flax Seed and Its Relationship with Other Seed Characters / A. Diederichsen, J.Ph. Raneya, S.D. Duguid // *Crop sci.* – 2005. – Vol. 46, № 1. – P. 365–371.
14. Diederichsen, A. Seed colour, seed weight and seed oil content in *Linum usitatissimum* accessions held by Plant Gene Resources of Canada / A. Diederichsen, J. Ph. Raneya // *Plant Breed.* – 2006. – Vol. 125(4). – P. 372–377.
15. Климат и погода в Беларуси [Электронный ресурс] / Официальный сайт Республики Беларусь. – Режим доступа: <http://www.belarus.by/ru/about-belarus/climate-and-weather> – Дата доступа: 11.07.2013.
16. Шкляр, А.Х. Климатические ресурсы Белоруссии и их использование в сельском хозяйстве / А.Х. Шкляр. – Минск: Выш. школа, 1973. – 80 с.
17. Минкевич, И.А. Лен масличный / И.А. Минкевич. – М.: Сельхозгиз, 1957. – 89 с.
18. Брач, Н.Б. Корреляционный анализ признаков, характеризующих длину вегетационного периода у льна-долгунца // Селекция и генетика технических культур / Сб. науч. тр. по прикл. бот., генет. и селекц. – Л., 1987. – Т. 113. – С. 46–53.
19. Heinrich, L. Linen: From Flax Seed to Woven Cloth / L. Heinrich. – Atglen, PA.: Schiffer Publishing, 2010. – 256 p.
20. Вакула, С.И. Анализ межсортовой изменчивости льна масличного (*Linum usitatissimum* L.) / С.И. Вакула // Молодежь в науке: Прил. к жур. «Весці НАН Беларусі» Ч.1 Сер. биол. наук; Сер. мед. Наук. – Минск: Бел. Наука, 2008. – С. 51–56.
21. Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород 2012 [Электронный ресурс] / Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений. – Режим доступа: <http://sorttest.by/gosudarstvennyu-reestr-sortov-i-dre> – Дата доступа: 11.07.2013.
22. Gupta, S.C. Gene action for oil yield and component characters in linseed / S.C. Gupta, S.L. Godawat, K.K. Kansal // *Indian J. agr. Res.* – 1990. – Т. 24, № 1. – P. 45–48.
23. Oomah, B.D. Flaxseed proteins – a review / B.D. Oomah, G. Mazza // *Food Chemistry.* – Vol. 48, Iss. 2. – 1993. – P. 109–114.
24. Паронян, В. Технология жиров и жирозаменителей / В. Паронян. – М.: ДеЛи принт, 2006. – 760 с.
25. Oomah, B.D. Phytic acid content of flaxseed as influenced by cultivar, growing season, and location / B.D. Oomah, E.O. Kenaschuk, G. Mazza // *J. Agric. Food Chem.* – 1996. – Vol. 44. – P. 2663–2666.
26. Минеев, В.Г. Агрохимия / В.Г. Минеев. – М: КолосС, 2004. – 719 с.
27. Moraghan, J.T. Accumulation of cadmium and selected elements in flax seed grown on a calcareous soil / J.T. Moraghan // *Plant and Soil.* – 1993. – Vol. 150(1). – P. 61–68.
28. Скальный, А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А.В. Скальный. – М.: Оникс 21 век, 2004. – 216 с.
29. Tour'e, Al. Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits / Al. Tour'e, Xu Xueming // *Comprehensive rev. in food science and food safety.* – Vol. 9. – 2010. – P. 261–269.
30. Сравнительный анализ содержания секоизоларицирезинола диглюкозида а оболочках семян льна масличного различных сортов / В.Н. Леонтьев [и др.] // Труды БГТУ. – Минск, 2007. – Вып. 15. – С. 169–172. – Сер. IV, Химия и технология органических в-в.

Дата поступления статьи 29 июля 2013 г.

ПЦР-ОСНОВАННОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ГОМОЛОГА ГЕНОВ *HcrVf* ИЗ ГЕНОМА ГРУШИ СОРТА ПАМЯТЬ ЯКОВЛЕВА

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

Введение

Груша является одной из ведущих плодовых культур умеренного пояса. По данным FAO, объем производства плодов груши в 2010 г. составил более 22 млн. т., заняв второе место после яблони среди плодовых. В настоящее время груша рассматривается как важный экспортный вид в садоводстве Республики Беларусь, так как в мире постоянно растет спрос на ее свежие плоды. При выращивании этой культуры плодороды сталкиваются с рядом проблем, среди которых важное место занимает распространение различных инфекций. Одним из наиболее опасных заболеваний груши в промышленных садах является парша обыкновенная, вызываемая грибными патогенами рода *Venturia*. Сорты груши могут поражаться двумя видами *Venturia*. Уссурийская груша (*P. ussuriensis* Maxim.), груша Бретшнейдера (*P. bretschnideri* Rehd.) и груша грушелистная (японская) (*P. pyrifolia* Naka) восприимчивы к *V. nashicola*, а европейская груша (*P. communis* L.) – к *V. pirina* Aderh. [1, 2]. Интенсивному размножению патогена способствует высокая влажность воздуха, характерная для Беларуси. Особенно широко болезнь распространяется в дождливое лето. На пораженных паршой плодах и листьях возникают темные бархатистые пятна, при сильном поражении дерева его плоды трескаются, а листья осыпаются. По данным разных авторов, потери урожая, вызванные данным заболеванием, могут составлять до 50–70%. Помимо этого, пораженные паршой деревья менее морозостойки.

Существует несколько методов защиты растений от этого заболевания. Наиболее распространенным является химический способ, при котором происходит обработка деревьев фунгицидами, причем число таких обработок может достигать 15 в год. Недостатки этого способа очевидны – высокая трудоемкость, дороговизна, загрязнение окружающей среды и повышение содержания ксенобиотиков в плодах.

Большинство возделываемых в Европе сортов груши являются в той или иной степени восприимчивыми к парше [3]. Поэтому в селекции груши приоритетным становится направление по созданию высокопродуктивных сортов, имеющих генетическую устойчивость к парше в сочетании с хорошим качеством плодов [4]. С этой целью ведется направленный поиск аллельных форм генов в геномах невосприимчивых сортов, обеспечивающих такую устойчивость, для последующего использования их в селекционном процессе.

По имеющимся в литературе сведениям, в формировании устойчивости к различным возбудителям немаловажную роль играют R-гены. Устойчивость, определяемая этими генами, обеспечивается реакцией гиперчувствительности, ведущей к гибели зараженной клетки, что препятствует дальнейшему распространению патогена. Продукты R-генов являются рецепторами, взаимодействующими с белками, кодируемыми Avr-генами патогена. Такое взаимодействие запускает сигнальный каскад, в результате которого активируется система защиты растений от патогена [5].

Среди растений первый кластер R-генов, названный *Cf*, был найден у томата. Гены этого кластера обеспечивают устойчивость томата к *Cladosporium fulvum* [6, 7]. Впоследствии гомологичные области были описаны у многих растений, находящихся довольно далеко от томата в эволюционном отношении. Среди ближайших родственников *Pyrus* лучше всего изучен геном яблони. Для яблони был описан *Vf*-кластер R-генов [8]. Первичное заключение о функции генов кластера было сделано на основе гомологии с генами *Cf* кластера томата, позже его подтвердили экспериментально [8, 9]. *Vf*-гены наследуются как доминантные. Способ доминирования – неполный, так как гомозиготы по этим генам обычно более устойчивы по сравнению с гетерозиготами. Предполагают, что степень выраженности

реакции растения на проникновение патогена может зависеть от других генов того же кластера, а также от генов-модификаторов [9].

Геном груши и яблони имеет много общего в структуре и организации [10, 11]. Их нуклеотидные последовательности идентичны на 96,35% [12]. Высока вероятность того, что геном груши

также содержит гены устойчивости к парше, гомологичные *HcrVf* генам яблони, которые могут обладать функциональной активностью. В связи с этим, целью данного исследования являлось выделение из генома устойчивого к парше сорта груши последовательности, гомологичной *HcrVf* генам яблони, и анализ ее структуры.

Материалы и методы

Исследования проводились на двух различных генотипах груши, один из которых – Память Яковлева – являлся устойчивым, в то время как второй – сортообразец 90-39/65 – восприимчивым. Образцы груши получены из питомника РУП «Институт плодородия». Поиск полиморфизма между исследуемыми генотипами проводили при помощи ДНК-маркеров к *Vf*-генам яблони. Предположительный гомолог одного из генов *Vf*-кластера яблони был найден в геноме устойчивого сорта груши Память Яковлева с помощью праймеров FD5for (5'-ATGGAGAGACCATGAGAGTTG-3') и FD5rev (5'-TACTGGCATAATCGTCGCAAG-3'), амплифицирующих открытую рамку считывания гена *hcrVf2*, придающего устойчивость видам рода *Malus* к возбудителю парши яблони *V. inaequalis* [13]. Амплификацию проводили в соответствии с [13]. Остальные маркеры, использованные в исследовании, не выявили полиморфизма между изучаемыми генотипами (данные не представлены).

Полученный продукт амплификации размером около 3000 п.н. после электрофоретического разделения был выделен из геля с использованием GeneJet™ Gel Extraction Kit

(Thermo scientific (EC)) согласно протоколу производителя. Клонирование в плазмиду pTZ57R/T и последующую трансформацию *E. coli* DH5α проводили с помощью Ins TA-clone™ 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)). Фрагмент, встроенный в плазмидную ДНК, секвенировали с помощью праймеров к последовательности полилинкера вектора pTZ57R/T M13 и специально выбранных внутренних праймеров к исследуемой нуклеотидной последовательности. 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

Сорт груши Память Яковлева характеризуется высокой устойчивостью к парше. Он был получен в результате скрещивания сорта Тёма с французским сортом Оливье де Серр. Сорт Тёма представляет собой межвидовой гибрид сорта европейской груши Финляндская желтая с уссурийской грушей.

Для выделения гомологов семейства генов *HcrVf* из генома груши был использован метод ПЦР-основанного клонирования. В результате амплификации с праймерами FD5, ограничивающими открытую рамку считывания генов-гомологов *HcrVf* яблони, в геноме устойчивого к парше сорта груши Память Яковлева выявлялся фрагмент длиной 3081 п.н. У восприим-

чивого образца 90-39/65 данный фрагмент отсутствовал. Фрагмент был клонирован и затем секвенирован в прямом и обратном направлении с помощью дополнительных праймеров к его внутренней части. Последовательность получила название *PVf1* (номер доступа в GenBank – KC806058). Сравнение нуклеотидной последовательности *PVf1* с базой данных GenBank показало, что она гомологична последовательностям кластера генов яблони *HcrVf* (табл. 1). В частности, степень идентичности последовательности *PVf1* из генома груши и последовательности гена яблони *HcrVf2*, который участвует в формировании устойчивости к парше, составляет 93,1%.

Таблица 1

**Степень идентичности нуклеотидной последовательности *PVf1*
с последовательностями семейства генов яблони *HcrVf***

Номер доступа в GenBank	Название гена	Источник гена	Длина последовательности	Процент попарной идентичности	E Value
AJ297739	<i>hcrvf1</i>	<i>Malus floribunda</i>	1109	92,5	0
AJ297740	<i>hcrvf2</i>	<i>Malus floribunda</i>	1822	93,1	0
AJ297741	<i>hcrvf3</i>	<i>Malus floribunda</i>	1929	93,1	0

Поиск по базе данных Plant Resistance Genes (<http://prgdb.crg.eu/>), содержащей более 16 000 известных и гипотетических R-генов 192 видов растений, отвечающих за устойчивость к 115 различным патогенам, также выявил гомологию изучаемой последовательности с R-генами других растений.

Нуклеотидная последовательность *PVf1* содержит открытую рамку считывания длиной в 3036 п.о., которая была транслирована в последовательность гипотетического белка размером в 1012 аминокислотных остатков. Известно, что R-гены растений кодируют продукты, участвующие в распознавании *Avr*-белков патогена. По своей структуре они представляют собой достаточно гетерогенную группу, в которой выделяют 7 классов в зависимости от присутствия определенных структурных мотивов. Чаще всего в структуре белков, кодируемых R-генами, отмечают протеинкиназные каталитические домены и переменное число лейцин-богатых повторов (LRR). LRR участвуют в связывании лигандов за счет белок-белковых взаимодействий. Клеточная локализация белковых продуктов R-генов различна. Часть из них является цитоплазматическими белками (некоторые – прикрепленными к цитоплазматической мембране), в то время как другие представляют собой рецептороподобные структуры, имеющие внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены [14].

Поиск консервативных доменов в последовательности исследуемого гипотетического белка с помощью базы данных консервативных доменов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) выявил в нем следующие структуры:

1. N-концевой домен лейцин-богатого повтора – короткий мотив, присутствующий во многих белках с различными функциями и

клеточной локализацией. Этот домен часто встречается на N-конце тандемных лейцин-богатых повторов [15].

2. LRRRI – лейцин богатые повторы (LRRs) из подсемейства рибонуклеаз-подобных ингибиторов (RI). Представляют собой мотивы из 20–29 остатков. Такие структуры присутствуют во многих белках, вовлеченных в белок-белковые взаимодействия с различными функциями и клеточной локализацией. LRRs соответствуют структурной единице, состоящей из бета-цепи и альфа-спирали. Исследуемая последовательность гипотетического белка состоит из 12 цепей, соответствующих 11 полным повторам. Подобные структуры присутствуют в подсемействе белков, активирующих ГТФазу Ran (*RanGAP1*) [16, 17].

Примечательно, что при поиске консервативных доменов в аминокислотной последовательности белка *Hcrvf2* были найдены эти же структуры (рис. 1).

Интересно отметить, что сходные R-генам структуры присутствуют и в геноме животных. Была найдена гомология между белками, кодируемыми R-генами, и белками-регуляторами апоптоза в клетках животных, что указывает на консервативность реакции на проникновение патогена у эукариотических организмов [18].

В настоящее время активно ведутся работы по поиску новых генов, формирующих устойчивость плодовых культур к парше. К кандидатам на роль таких генов у яблони относят последовательности, предположительно кодирующие рецептороподобные белки, серии генов MAM, выделенные посредством ПЦР-основанного клонирования из генома *M. micromalus*, и серии генов MAB, выделенные из генома *M. baccata* [19]. Эти последовательности, как видно из рис. 2, гомологичны *PVf1*.

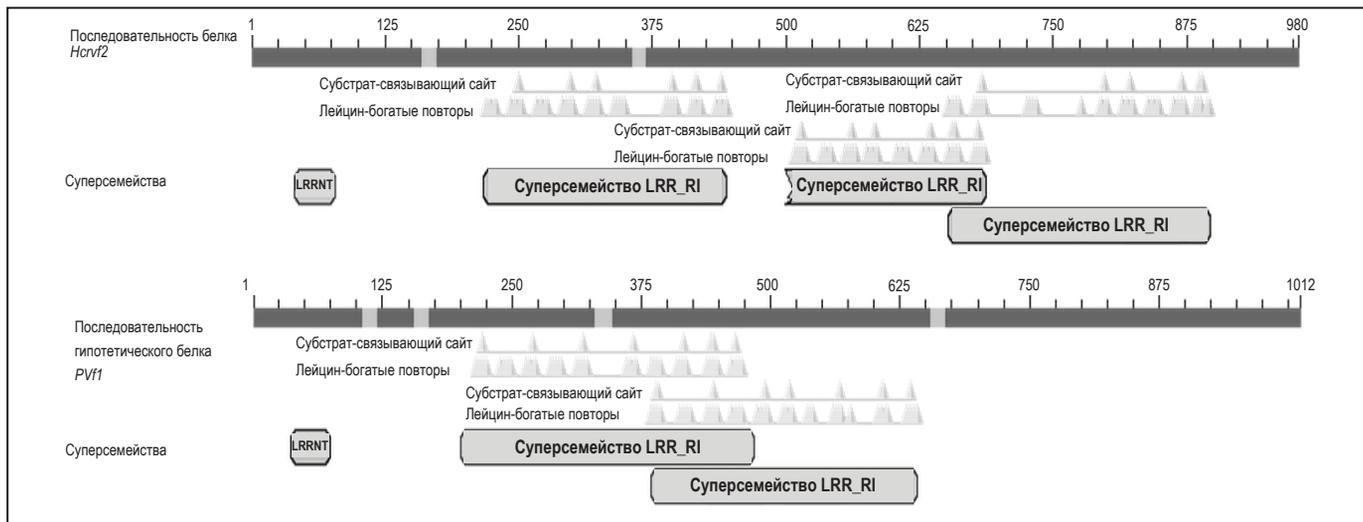


Рис. 1. Консервативные домены белка *HcrVf* и гипотетического белка *PVf1*

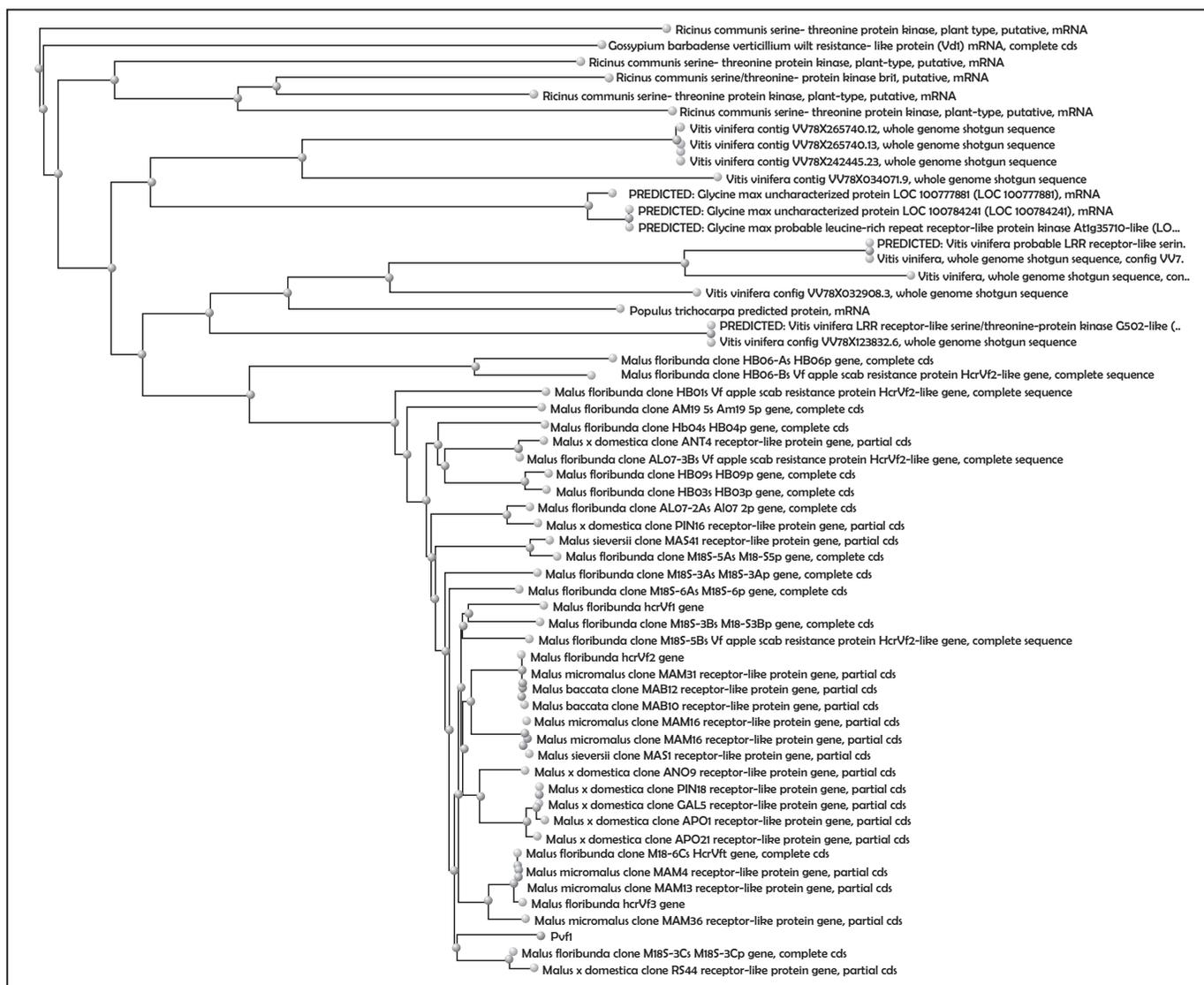


Рис. 2. Дендрограмма генетического родства нуклеотидной последовательности *PVf1* с последовательностями из базы данных GenBank

На сегодняшний день число известных генов груши, отвечающих за устойчивость к парше, невелико. Исследование межвидовых гибридов груши позволило идентифицировать ген *Vn*, обеспечивающий устойчивость к *V. nashicola* [20]. В геноме японской груши сорта Kinchaku обнаружен ген *Vnk* [21]. Он также обеспечивает устойчивость к *V. Nashicola*, как и ген *Rvn2*, картированный в геноме сорта европейской груши Bartlett [22]. Идентифици-

рованный позже у сорта европейской груши Navara ген *Rvp1* участвует в формировании устойчивости к виду *V. pirina* [3]. В геноме груши обнаружено также два больших QTL локуса на 3 и 7 хромосомах, ассоциированных с устойчивостью к *V. pirina* [23]. Нуклеотидные последовательности генов устойчивости к парше груши пока не установлены. Последовательность *PVf1* может являться кандидатом на эту роль.

Заключение

В результате ПЦР-основанного клонирования из генома высокоустойчивого к парше сорта груши Память Яковлева была выделена последовательность *PVf1*. Анализ секвенированной последовательности позволяет сделать

вывод о ее гомологии с R-генами, в частности, с геном устойчивости к парше яблони *Hcrvf2*. Последовательность *PVf1* может служить кандидатом на роль гена устойчивости к парше в геноме груши.

Список используемых источников

1. Studies in pear scab. II. Taxonomy of the causal fungus of Japanese pear scab / S. Tanaka, K. Yamamoto // Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. – 1964. – Vol. 29. – P. 128–136.
2. Heterothallism and variability in *Venturia pirina* / M.H. Langford, E.N. Keitt // Phytopathology. – 1942. – Vol. 32. – P. 357–369.
3. A new pear scab resistance gene *Rvp1* from the European pear cultivar ‘Navara’ maps in a genomic region syntenic to an apple scab resistance gene cluster on linkage group 2 / L. Bouvier [et al.] // Tree Genet. and Genom. – 2012. – Vol. 8. – P. 53–60.
4. Pear breeding for scab and *Psylla* resistance / Y. Lespinasse [et al.] // Acta Hort. – 2008. – Vol. 800. – P. 475–481.
5. Genetics and molecular analysis of tomato *Cf* genes for resistance of *Cladosporium fulvum* / C.M. Thomas [et al.] // Phil. Trans. R. Soc. Lond. – 1998. – Vol. 353. – P. 1413–1424.
6. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins / M.S. Dixon [et al.] // Cell. – 1996. – Vol. 84. – P. 451–459.
7. Isolation of the tomato *Cf-9* for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging / D.A. Jones [et al.] // Science. – 1994. – Vol. 266. – P. 789–793.
8. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance / B.A. Vinatzer [et al.] // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2001. – Vol. 14. – P. 507–515.
9. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety / E. Belfanti [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 886–890.
10. Integrated genetic linkage maps for pear based on SSR and AFLP markers / T. Yamamoto [et al.] // Breeding Science. – 2007. – Vol. 57. – P. 321–329.
11. Update on comparative genome mapping between *Malus* and *Pyrus* / J.-M. Celton [et al.] // BMC Research Notes. – 2009. – Vol. 2. – P. 182.
12. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* (Borkh.) / R. Velasco, A. Zharkikh, J.e.a. Affourtit // Nature genetics. – 2010. – Vol. 42, № 10. – P. 833–841.
13. *HcrVf* paralogs are present on linkage groups 1 and 6 of *Malus* / G.A.L. Brogini [et al.] // Genome. – 2009. – Vol. 52. – P. 129–138.
14. Receptor-like proteins involved in plant disease resistance / M. Kruijt, M.J.D. de Kock, P.J.G.M. de Wit // Molecular plant pathology. – 2005. – Vol. 6. – P. 85–97.
15. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif / B. Kobe, J. Deisenhofer // Trends Biochemical Sciences. – 1994. – Vol. 19, № 10. – P. 415–421.
16. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif / B. Kobe, A.V. Kajava // Current Opinion in Structural Biology. – 2001. – Vol. 11, № 6. – P. 725–732.

17. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins / A.V. Kajava // *J. of Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 277, № 3. – P. 519–527.
18. Programmed cell death in plants resembles apoptosis of animals / C. Collazo, O. Chacón, O. Borrás // *Biología Aplicada*. – 2006. – Vol. 23. – P. 1–10.
19. Molecular cloning and analysis of apple *HcrVf* resistance gene paralogs in a collection of related *Malus* species / F. Dunemann [et al.] // *Tree Genet. and Genom.* – 2012. – Vol. 8, № 5. – P. 1095–1109.
20. Inheritance of resistance to pear scab from European pears to Asian pears / K. Abe [et al.] // *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* – 2000. – Vol. 1. – P. 1–8.
21. Genetic mapping of the pear scab resistance gene *Vnk* of Japanese pear cultivar Kinchaku / S. Terakami [et al.] // *Theor Appl Genet.* – 2006. – Vol. 113. – P. 743–752.
22. Development of AFLP and CAPS markers linked to the scab resistance gene, *Rvn2*, in an inter-specific hybrid pear (*Pyrus* spp.) / K.H. Cho [et al.] // *J. Hortic Sci. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 84. – P. 619–624.
23. Pear scab resistance QTLs via a European pear (*Pyrus communis*) linkage map / L. Pierantoni [et al.] // *Tree Genet. and Genom.* – 2007. – Vol. 3. – P. 311–317.

Дата поступления статьи 11 июня 2013 г.

АНАЛИЗ ВАРИАНТОВ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ *atpA* И *atpB* У ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.), ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ В БЕЛАРУСИ

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

²РУП «Опытная научная станция по сахарной свекле»
Республика Беларусь, 222603, Минская обл., г. Несвиж, ул. Озерная, 1

Введение

Методы современной селекции и развитие гибридных сортов перекрестно-опыляемой сахарной свеклы включают отбор и получение инбредных закрепителей стерильности (О-типов) и их стерильных аналогов, а также тестирование на комбинационную способность отобранных односемянных линий с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) и многосемянных фертильных опылителей [1]. Производство гибридных семян, таким образом, основано на использовании признака ЦМС т.н. Оуэновского типа, который наследуется по материнской линии и приводит к нарушению микроспорогенеза и образованию летальной (стерильной) пыльцы. Он является полигенным и проявляется при взаимодействии рецессивных аллелей нескольких ядерных генов, называемых закрепителями стерильности, а также цитоплазматических детерминант, расположенных в митохондриальном (мт) геноме [2]. Из ядерных генов, отвечающих за проявление ЦМС у сахарной свеклы, к настоящему времени изучен на молекулярно-генетическом уровне только один, локализованный на III хромосоме и обозначенный как *Rf1* [3]. Для мтДНК было показано, что при переходе к состоянию ЦМС она подвергается целому ряду структурных перестроек, набор которых стабилен и позволяет дискриминировать мужскостерильные и фертильные растения молекулярно-биологическими методами. Сравнительное изучение мт-генома растений с N- и S-типом цитоплазмы с использованием рестрикционного анализа, метода блот-гибридизации и секвенирования выявило для митохондрий S-цитоплазмы гены – *cob* (ген апоцитохрома b), *cox2* (ген 2-ой субъединицы цитохромоксидазы c), *nad1* (ген 1-ой субъ-

диницы НАДН-дегидрогеназного комплекса), *atpB* и *atpA* (гены б-ой и α субъединицы F₁F₀-АТФазного комплекса митохондрий), где эти перестройки наблюдаются. Набор множественных преобразований митохондриального генома в районах этих генов выявлен у всех ЦМС-форм [4].

Задачей наших исследований являлся анализ вариантов митохондриальных генов-маркеров *atpB* и *atpA*. Последовательность области гена *atpA* для нормального типа мтДНК (N-тип цитоплазмы) и ЦМС-типа мтДНК (S-тип цитоплазмы) приведена в базе данных EMBL под номерами X68690 (2699 п.н.) и X68691 (2847 п.н.) соответственно. Рекомбинационные перестройки у ЦМС-растений происходят в 5'-области, прилегающей к гену *atpA*. Используя эти данные, российскими исследователями была подобрана система из трех праймеров, которая применяется для амплификации специфичных фрагментов ДНК обоих типов мт-генома [5]. После проведения амплификации при совместном использовании трех праймеров в реакции должны образовываться либо два продукта реакции для гетероплазматичных растений, либо один амплификационный продукт (специфичный для митохондрий нормальных или стерильных растений) в случае гомоплазматичных растений. Для гена *atpB* стратегия проведения амплификации с тремя праймерами была сходной [2].

Определение вариантов мт генов в популяциях растений линий и гибридов сахарной свеклы, используемых в белорусской селекционной практике, было мотивировано нуждами селекционеров, работающих с этим материалом. Основываясь на данных молекулярного маркирования, они, уже на первом году

вегетации свекольного растения, т.е. еще до появления генеративного побега, получили бы возможность распознавать растения, несущие признак ЦМС и могли использовать их для отборов педигри материнских линий и в последующих скрещиваниях. Помимо этого, при проведении селекционерами оценочных опытов гибридного материала сахарной све-

клы, поступающего в Беларусь из-за рубежа от коммерческих фирм Германии, Дании, Нидерландов, Бельгии (40–50 гибридов ежегодно), установление типа цитоплазмы в популяциях растений гибридов позволяет опосредованно определить качество (выравненность) закупленного семенного материала и выявить возможные «генетические загрязнения».

Материалы и методы

Исследовали 43 популяции сахарной свеклы, представляющих селекционные линии – материнские компоненты скрещиваний с ЦМС (8), фертильные линии гиногенетического происхождения (15), пары родительских компонентов скрещиваний (4 материнские линии с ЦМС и 4 отцовских популяции опылителей) и 4 гибридные комбинации на их основе (всего 12), а также коммерческие гибриды зарубежной селекции: Ненси, Золеа, Берни, Триада, Ярыса, Агния, Модус, Эврика (8). Гиногенетические линии были созданы нами в лаборатории экологической генетики и биотехнологии Института генетики и цитологии методом экспериментальной гаплоидии *in vitro* [6] и впоследствии репродуцированы в условиях Биологической опытной станции ИГиЦ и Опытной научной станции по сахарной свекле (г. Несвиж). Растительный материал для выделения ДНК был предоставлен селекционерами Опытной научной станции по сахарной

свекле. В общей сложности были исследованы варианты мт генов *atpB* и *atpA* у 1000 растений сахарной свеклы.

Для выделения ДНК использовали методику [7]. Определение размера ампликонов в агарозном геле для установления вариантов митохондриальных генов *atpA* и *atpB*, соответствующих N, S и смешанным типам цитоплазмы проводили по методу [5]. Использовали системы из трех праймеров (общий, N-специфичный, S-специфичный) для двух указанных генов. Амплификация включала: 1-ый этап – 95 °С 4 мин, 2-ой этап – 45 циклов (94 °С – 28 с, отжиг при 58,6 °С – 28 с, 72 °С – 43 с), 3-ий этап – финальная элонгация 7 мин при 72 °С, 4-ый этап – 4 °С – ∞. Размер продукта для *atpB* для N-типа цитоплазмы был равен 266 п.н., для S-типа – 389 п.н. Для гена *atpA* размер ампликона, соответствующего N-цитоплазме, был равен 634 п.н., цитоплазме S-типа – 727 п.н.

Результаты исследования

Определение вариантов S- и N-цитоплазмы путем анализа митохондриальных генов *atpB* и *atpA* в линейном и гибридном материале сахарной свеклы.

Коммерческие гибриды сахарной свеклы зарубежной селекции

Обобщенные результаты анализа митохондриальных генов в популяциях зарубежных коммерческих гибридов (табл. 1) показывают,

что спектры продуктов амплификации гена *atpB* были в основном двухполосными (S_N), а *atpA* – однополосными (S) (рис. 1). Фертильных растений (с N-вариантом цитоплазмы) в исследованных популяциях практически не было, что соответствует стандарту коммерческих гибридов. Количество растений в популяциях гибридов варьировало от 42 до 54.

Таблица 1

Результаты анализа вариантов митохондриальных генов *atpB* и *atpA* в популяциях 8 коммерческих зарубежных гибридов сахарной свеклы

Гибрид	<i>atpB</i>				<i>atpA</i>			
	S	S_N	N	N_S	S	S_N	N	N_S
Ненси	2	45	4	3	54	0	0	0
Золеа	3	51	0	0	50	4	0	0
Берни	0	45	0	9	54	0	0	0

Продолжение табл. 1

Гибрид	<i>atp6</i>				<i>atpA</i>			
	S	S _N	N	N _S	S	S _N	N	N _S
Триада	0	54	0	0	54	0	0	0
Ярыса	0	54	0	0	54	0	0	0
Агния	6	46	0	0	52	0	0	0
Модус	0	42	0	0	42	0	0	0
Эврика	1	49	0	0	50	0	0	0

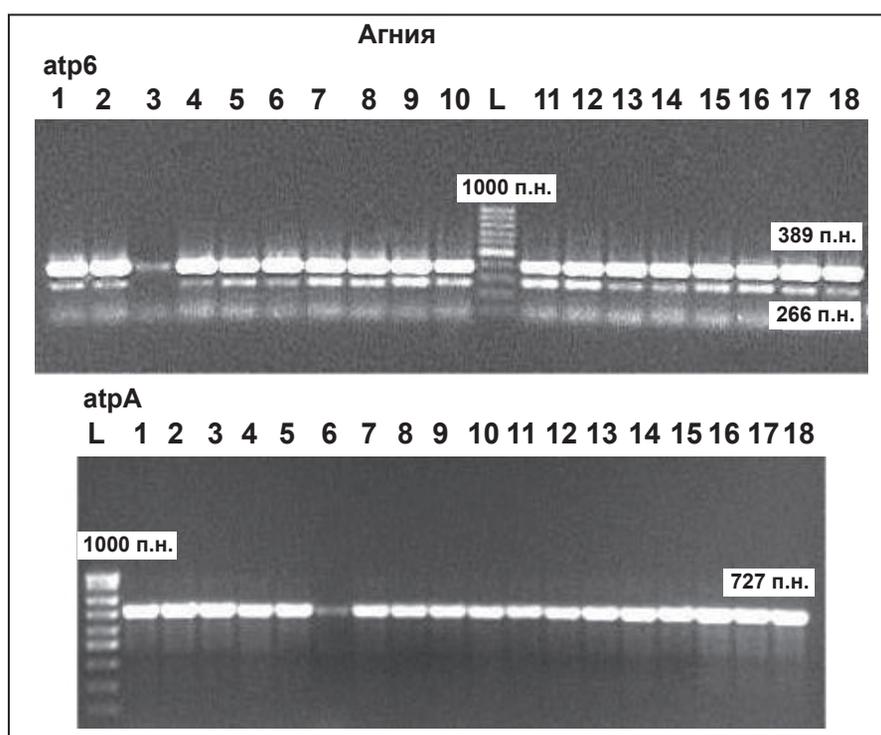


Рис. 1. Результаты электрофоретического разделения ампликонов мт генов *atp6* (гетероплазмия типа S_N,верху) и *atpA* (гомоплазмия S, внизу) в популяции растений сахарной свеклы гибрида Агния (представлены растения № 1–18). Маркер L (Ladder 1000bp)

Линии

В коллекции из 30 диплоидных линий сахарной свеклы, используемых в белорусской селекционной практике, 15 были отобраны селекционерами Опытной научной станции по сахарной свекле НАН Беларуси из пула мужски стерильных и фертильных линий, а остальные 15 линий были получены путем гиногенеза *in vitro* из фертильных растений-доноров от сортов Белоцерковская односемянная 40, Белорусская односемянная 69, Ялтушковская, Ганусовская односемянная 55, Верхняячская 103, и Янаш А3 и которые прошли несколько циклов семенной репродукции на той же станции. Всего было проанализировано 300 индивидуальных растений линейного материала.

Скрининг 8 селекционных линий сахарной свеклы с цитоплазматической мужской стерильностью по гену *atp6* выявил гетероплазмию, т.е. наличие у одних и тех же растений митохондрий, свойственных как S-, так и N-типам цитоплазм с количественным преобладанием S типа (S_N, рис. 2). У двух растений линии МС 15255 отмечены митохондрии только S-типа.

По гену *atpA* все образцы мужски стерильных линий МС 2/358 № 12 и МС 2/358 № 12-32 были гетероплазматичны (S_N вариант митохондриальной ДНК), остальные МС линии имели образцы с цитоплазмой S- или S_N-типа (табл. 2).

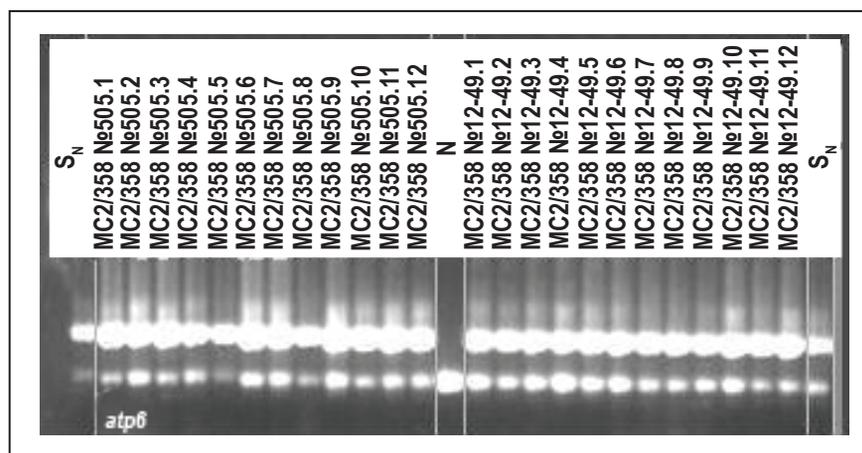


Рис. 2. Варианты гена *atpB* в популяциях растений сахарной свеклы двух селекционных линий с ЦМС (представлены растения № 1–12 линии MC2/358 № 505 и линии MC2/358 № 12–49). Контроль: N (фертильное растение) – в центре и S_N – по краям геля

Таблица 2

Результаты анализа вариантов митохондриальных генов *atpB* и *atpA* в популяциях 30 диплоидных линий сахарной свеклы (гиногенетических и селекционных)

Линия*	Количество образцов	<i>atpB</i>				<i>atpA</i>			
		S	S _N	N	N _s	S	S _N	N	N _s
Гиногенетические линии									
Бц40СУГ35РК300Gu	10		2	5	3		2	8	
Янаш 81678(4х)-4(2)	10			10				10	
Бел69-3(5)РК	10			10				10	
Ялт(4х)ДГ	10			10				10	
Янаш 81678(4х)-2(2)	10			10				10	
Бц40СУГ35РК300Gu	10			10				10	
81678(4х)-2(1)	10			10				10	
Бел69-І 300Gu	10			10				10	
Янаш 81678(4х)-1(3)РК	10			10				10	
Бц40СУГ	10			10				10	
Бел69-І	10			10				10	
Янаш 49РК	10		10			4	6		
Ган о 55-9(2)	10			10				10	
В103(4х)ДГ	10		10			9	1		
ЯнКУГ РК	10		10			3	7		
Селекционные линии									
МС 15255	10	2	8			1	9		
ОП 411	10			10				10	
МС 119	10		10			6	4		
ОП Б069(Ік)п884/96	10			10				10	
Ган о 55 п587/99	10		10				10		
ОТ 1/603 №488	10		1	9			1	9	
МС 2/358 №12-28	10		10			1	9		

Продолжение табл. 2

Линия*	Количество образцов	<i>atp6</i>				<i>atpA</i>			
		S	S _N	N	N _S	S	S _N	N	N _S
Гиногенетические линии									
ОТ 1/603 №17-28	10			10				10	
МС 2/358 №12	10		10				10		
ОТ 1/603 №17	10			10				10	
МС 2/358 №12-49	10		10			5	5		
МС 2/358 №12-32	10		10				10		
ОТ 1/603 №17-32	10			10				10	
МС 2/358 №505	10		10			4	6		
МС 2/358 №507	10		10			6	4		

* – все линии гиногенетического происхождения были индуцированы в культуре *in vitro* из единичных клеток фертильных растений доноров; среди селекционных линий образцы с маркировкой «МС» несли признак ЦМС, образцы «ОП» и «ОТ» были фертильными.

Анализ обоих цитоплазматических генов для 6 фертильных селекционных линий выявил наличие митохондрий только N-типа у подавляющего большинства растений (59 из 60). Одно растение фертильной линии ОП 1/603 № 488 характеризовалось наличием митохон-

дрий двух типов с преобладанием S-варианта (рис. 3). Линия Ганусовская односемянная 55 п 587/99 резко выделялась из этой группы, поскольку было показано, что все ее растения имели варианты цитоплазматических генов *atpA* и *atp6*, свойственные цитоплазме S_N-типа.

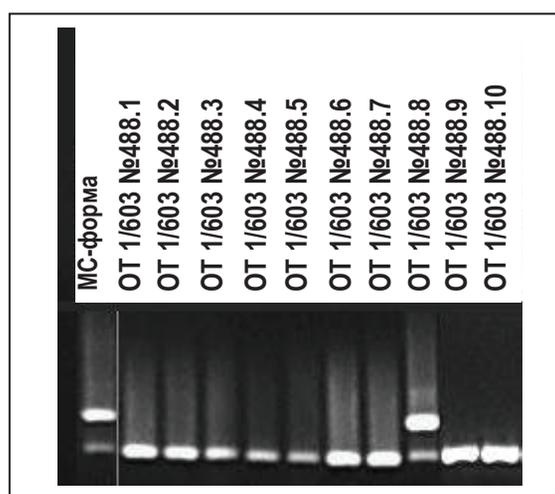


Рис. 3. Пример единичного растения № 8 фертильной линии ОТ 1/603 № 488 с S_N-типом гена *atp6*. Все остальные растения имеют варианты этого мт гена, соответствующие N-типу цитоплазмы.
Контроль: «МС форма» (S_N-тип) геля

В группе 15 линий гиногенетического происхождения по результатам анализа указанных двух цитоплазматических генов выделяются несколько подгрупп, имеющих общее происхождение: три линии, созданные на основе сорта Белорусская односемянная 69, три линии на основе Белоцерковской односемянной 40, четыре линии на основе сортообразца 81678 и линия Ялтушковская ДГ имели цитоплазму N-типа; а

две линии на основе сорта Янаш А3 и Верхняя-ская 103 ДГ характеризовались наличием вариантов, свойственных стерильной цитоплазме (S- и S_N-типа). Однако линия Бц40СУГ35РК300Gu, несмотря на преобладание образцов с N-типом цитоплазмы, вероятно из-за конверсии, имела образцы с S_N- и N_S-вариантами цитоплазмы. Обобщенные результаты анализа всех 30 линий представлены в табл. 2.

Гибридные комбинации белорусской селекции и их родительские линейные компоненты

При изучении линейного материала сахарной свеклы в популяциях были обнаружены растения как с цитоплазмой S-, так и N-типа, а также смешанного (S_N и N_S). Для подтверждения использования признака в качестве возможного маркера при молекулярно-генетической паспортизации гибридов были проанализированы популяции четырех отечественных гибридов и их родительских компонентов.

Материнские линии с ЦМС

Было показано, что из 4-х линий сахарной свеклы с признаком ЦМС, а именно MC 223-2, MC 2/358 № 322, MC2/358 № 10 и MC121(S-43-2/91), две линии (последние из этого перечня) являются лучшими в качестве материнского компонента для гибридизации, поскольку все растения первой (всего 24) и второй линии (20 из 21) характеризовались по обоим митохондриальным генам наличием вариантов, свойственных стерильной цитоплазме S- и S_N - типа. Поскольку все рас-

тения были замаркированы, выяснилось, что единственное растение под номером 5 линии MC121(S-43-2/91) по обоим генам характеризовалось митохондриями, свойственным нормальному типу цитоплазмы и оно было выбраковано из популяции линии с мужской стерильностью на ранних стадиях развития первого года вегетации, когда фенотипически данный признак не был еще распознаваем, т.е. еще до появления генеративных побегов с пыльниками. Эти две выровненные мужски стерильные линии могут представлять интерес для селекционеров, поскольку в комбинациях скрещиваний на их основе можно прогнозировать высокую степень гибридности. У двух других изученных мужски стерильных линий были обнаружены растения, которые по обоим генам характеризовались присутствием митохондрий нормального типа цитоплазмы, причем у линии MC 223-2 таких растений было 5 (рис. 4), а у MC 2/358 № 322 – два растения (табл. 3). Эти растения можно отнести к «генетическим загрязнениям» указанных линий с признаком ЦМС.

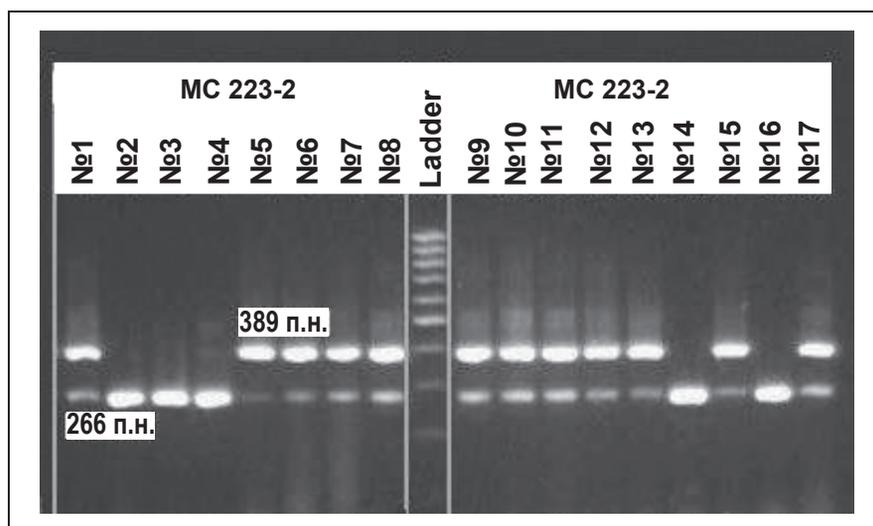


Рис. 4. Пример значительного числа фертильных растений (всего пять – № 2, 3, 4, 14, 16) с вариантом гена *atpB* N-типа в популяции мужски стерильной линии MC 223-2

Отцовские компонент-опылители

Анализ четырех отцовских компонентов скрещиваний с признаком многосемянности, запланированных для использования в качестве опылителей при создании гибридов, показал, что все растения линий MM 080 п40/90 и Л8159 (4х) характеризуются N-типом цитоплазмы по обоим цитоплазматическим генам. При этом только

одно растение линии MM 080 п40/90 помимо нормальной цитоплазмы по гену *atpB* содержало в минорных количествах митохондрии S-типа.

У гиногенетических линий Янаш СУГ, 2001 и Янаш 2, к 99/04 были выявлены многочисленные нарушения при формировании пыльцы, и они характеризовались в основном гетероплазмией типа S_N - и S-вариантами двух

изученных генов. Растения с N-типом цитоплазмы по генам *atpB* и *atpA* были единичными

(рис. 5, ген *atpB*, растение № 18 и рис. 6, ген *atpA*, растения № 18, 20, 21).

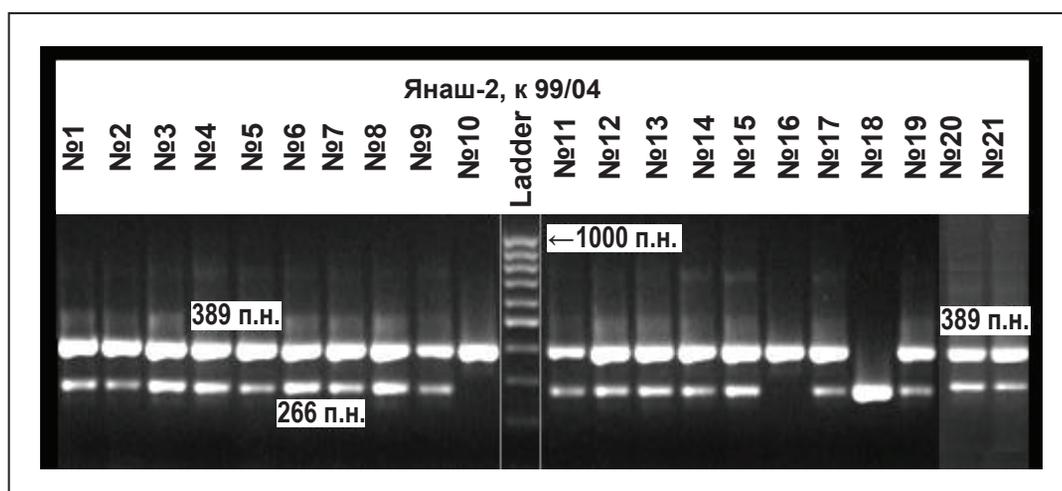


Рис. 5. Результаты электрофоретического разделения ампликонов мт-гена *atpB* у линии Янаш 2, к 99/04: растение № 18 содержит продукт реакции 266 п.н., специфичный для мт-генома N-цитоплазмы, растения № 10 и № 16 характеризуются наличием только S-типа цитоплазмы (продукт 389 п.н.), остальные растения представлены вариантом S_N (гетероплазмия). Маркер L (Ladder 1000bp)

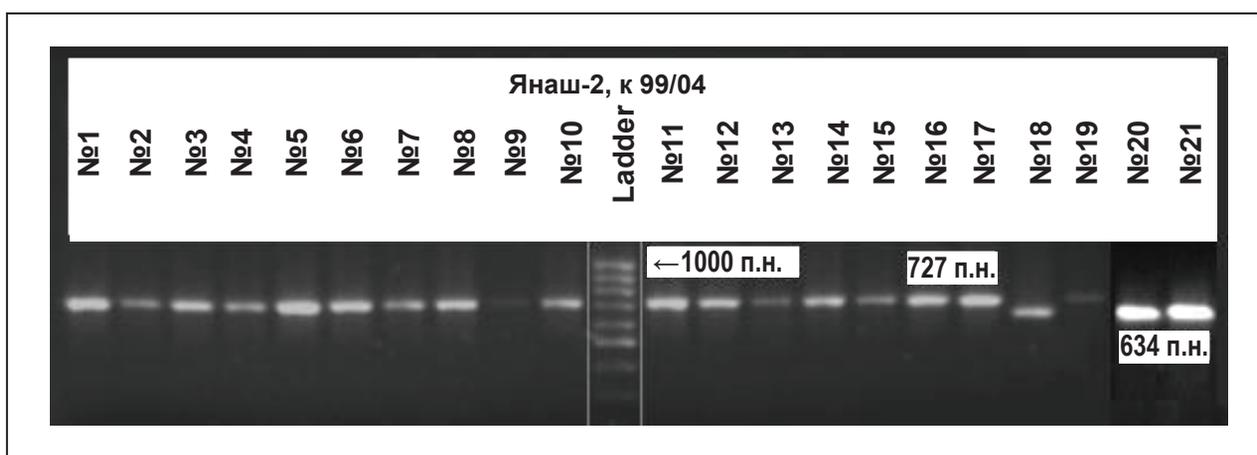


Рис. 6. Результаты электрофоретического разделения ампликонов мт-гена *atpA* в популяции растений линии Янаш 2, к 99/04. У большинства растений наблюдаются митохондрии S-типа (ампликон 727 п.н.), за исключением образцов №18, 20, 21 с митохондриями N-типа (ампликон 634 п.н.). Маркер L (Ladder 1000bp)

Гибридные комбинации

При характеристике диплоидных гибридов сахарной свеклы в популяциях комбинации МС 223-2 × ММ 080 п 40/90 были отмечены 3 растения из 30 исследованных (по обоим генам) и в комбинации МС 2/358 № 322 × Янаш СУГ, 2001 также 3 растения из 30 (№ 18, 24 и 30 по обоим генам) с N-типом цитоплазмы (рис. 7). Третий диплоидный гибрид МС 121 (S-43-2/91) × Янаш 2, к 99/04 был охарактеризован как лучший из трех, поскольку вся популяция из 30 растений

имела варианты генов, характерных для стерильной цитоплазмы. То же следует сказать о триплоидном МС 2/358 №10 × Л 8159 (4x) гибриде, у которого были выявлены два растения с вариантами генов, характерных для нормальной цитоплазмы по одному из генов, остальные были стерильными (S- и S_N -типа). В целом, выявлена высокая степень стерильности в популяциях растений четырех изученных гибридных комбинаций сахарной свеклы белорусской селекции, что характеризует их позитивно. Тем

не менее, выявлены 2 диплоидных гибрида «не-стерильность» которых, установленная в ходе изучения митохондриальных генов *atpA* и *atpB*, достигает 10%.

Обобщенные результаты анализа двух цитоплазматических генов *atpA* и *atpB* для гибридов белорусской селекции и их линий-компонентов представлены в табл. 3.

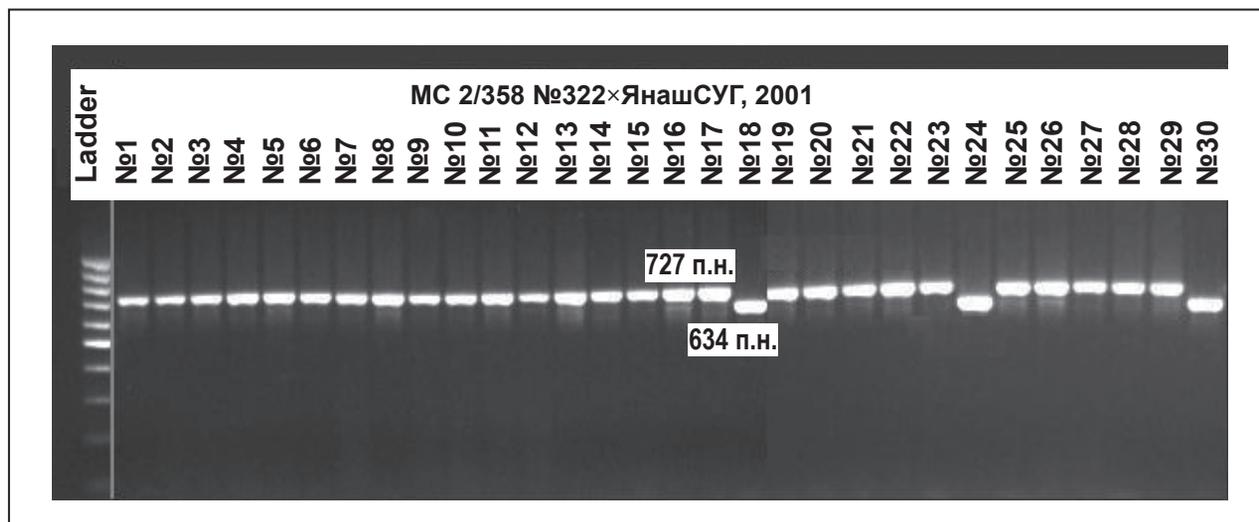


Рис. 7. Варианты гена *atpA* S-типа в популяции растений гибридной комбинации МС 2/358 № 322 × Янаш СУГ, 2001. Образцы № 18, 24 и 30 характеризовались N-типом цитоплазмы (по 2 генам). Маркер L (Ladder 1000bp)

Таблица 3

Анализ цитоплазматических генов *atpA* и *atpB* в популяциях растений сахарной свеклы селекционных линий РУП «Опытная научная станция по сахарной свекле» (г. Несвиж) и гибридов на их основе

Генотип*	Количество образцов	<i>atpB</i>				<i>atpA</i>			
		S	S _N	N	N _S	S	S _N	N	N _S
МС 223-2 × ММ 080 п40/90	30		27	3		22	5	3	
МС 223-2	21		16	5		10	6	2	3
ММ 080 п40/90	24			23	1			24	
МС 2/358 №322 × Янаш СУГ, 2001	30	21	6	3		27		3	
МС 2/358 №322	24		22	2		13	9	2	
Янаш СУГ, 2001	21		20	1		20		1	
МС 2/358 №10 × Л 8159 (4х)	29	11	17	1		18	10	1	
МС 2/358 №10	24		24			19	5		
Л 8159 (4х)	21			21				21	
МС 121 (S-43-2/91) × Янаш 2, к 99/04	30	2	28			18	12		
МС 121 (S-43-2/91)	21		20	1		18	2	1	
Янаш 2, к 99/04	21	2	18	1		18		3	

* – гибридные комбинации обозначены жирным шрифтом; образцы с маркировкой «МС» несли признак ЦМС (стерильные материнские формы), остальные популяции –многосемянные опылители, включая Янаш СУГ, 2001 и Янаш 2, к 99/04 гиногенетического происхождения (фертильные отцовские формы)

Обсуждение

Экспериментальные данные по анализу типа цитоплазмы в популяциях линейного и гибридного материала сахарной свеклы, используемого в белорусской селекции (всего 1000 растений), на основании обнаруженных вариантов двух мт генов *atp6* и *atpA*, выявили наличие трех основных групп образцов-растений с N-нормальной, S-стерильной и смешанной цитоплазмой с митохондриями S- и N-типа. В смешанном варианте в подавляющем большинстве случаев отмечена гетероплазмия с преобладающим S-компонентом стерильной цитоплазмы по сравнению с менее выраженным компонентом нормальной N-цитоплазмы, т.е. S_N , в редких случаях – N_S .

Митохондриальная гетероплазмия, или сосуществование в ткани альтернативных вариантов последовательности мт ДНК или более, чем одного митохондриального гаплотипа, широко распространена среди многоклеточных эукариот [8], в том числе высших растений, причем количество мутантных вариантов может меняться в поколениях. У сахарной свеклы обнаружено несколько типов N- и S- цитоплазм, в формировании Оуэновского типа ЦМС участвует Svulg-тип мтДНК, который характеризуется изменениями структуры и экспрессии генов, а также различиями в некодирующих областях [9]. Ее митохондриальный геном состоит из набора линейных и кольцевых субгеномных молекул различного размера с возможностью рекомбинации между ними благодаря наличию повторов. Эти молекулы могут независимо реплицироваться и содержаться в общем пуле мтДНК в неравных стехиометрических соотношениях. С помощью ПЦР в реальном времени и с использованием специфичных для N-типа и Svulg (Оуэновского)-типа маркеров (открытых рамок считывания и генов, но не *atp6* и *atpA*) было показано наличие всех исследованных маркеров мтДНК N-типа в мужски стерильных растениях и только некоторых специфичных маркеров Svulg – типа в фертильных растениях, что свидетельствовало в пользу гетероплазматичного характера организации мтДНК сахарной свеклы, но у фертильных растений она была неочевидной [10].

Наши результаты по вариантам генов *atp6* и *atpA* в популяциях линий и гибридов сахарной свеклы, используемых в белорусской се-

лекционной практике, хорошо согласуются с этими данными: в популяциях растений линий с ЦМС, коммерческих гибридов, гибридных комбинаций (табл. 1, 2, 3) гетероплазмия типа S_N – частое явление, в популяциях фертильных растений гетероплазмия также была выявлена, причем разной стехиометрии – и N_S - и S_N -типа (например, у линии Бц40СУГ35РК300Gy), и только чаще S_N типа (например, у гиногенетических линий Янаш 49РК, В103(4х)ДГ, ЯнКУГ РК, таблица 2). Показано также, что в популяциях растений и гибридов, и линий с ЦМС S_N тип гетероплазмии наблюдался чаще при исследовании вариантов гена *atp6*. Ген *atpA* характеризовался однополосными вариантами S и N и редко двухполосными вариантами типа S_N . Сопоставляя результаты молекулярного маркирования с полученными ранее данными по фенотипической характеристике растений (цитодиагностика пыльцевых зерен) указанных линий – гиногенетических на ранних этапах их формирования и единичных селекционных [11], мы пришли к заключению, что у тех линий, растения которых имели фертильную пыльцу, отмечены N-варианты мт генов, а в группе линий, индуцированных в культуре *in vitro* из гаплоидных клеток растений доноров сорта Янаш АЗ были обнаружены в больших количествах стерильные или полустерильные растения, а молекулярное маркирование выявило в популяциях этих гиногенетических линий S- и S_N -варианты генов. Используемый нами метод оценки позволил различать фертильные растения сахарной свеклы и стерильные (с основной фракцией митохондрий, характерных для S-типа цитоплазмы), но без ранжирования на полу- и полностью стерильные.

Поскольку сахарная свекла является облигатным перекрестником с пыльцой, разносимой насекомыми и ветром на большие расстояния, любые из ее линейных или гибридных популяций в случае репродукции при недостаточной изоляции могут содержать растения, к ним не относящиеся. Изучение вариантов не одного, а двух мт генов на замаркированных растениях этих популяций в ряде случаев может помочь распознать, принадлежит ли обнаруженное необычное растение к своей популяции или к чужой. Например, если по обоим вариантам мт генов количество необычных для популя-

ции растений одинаково, как в случае гибридной комбинации МС 2/358 №322 × Янаш СУГ, 2001 (табл. 3), где 3 растения имели варианты генов, характерные для фертильных растений с N-типом цитоплазмы, то эти три фертильных растения можно отнести к «генетическому загрязнению» данной гибридной популяции, гибридные растения которой должны быть стерильными. Если количество необычных для рассматриваемой популяции растений по результатам молекулярно-генетического анализа одного из мт генов не совпадает с их количеством по результатам молекулярно-генетического анализа второго мт гена, то трактовка происхождения таких растений в популяции и оценка «чистоты» или выровненности гибрида или линии усложняются. Эти данные помогают понять причины затруднений при разработке принципов паспортизации сортов такой перекрестноопыляемой культуры, как свекла. Уже на начальных стадиях применения микросателлитного маркирования для характеристики популяций и составлении молекулярно-генетических паспортов линий и гибридов сахарной свеклы нами было установлено, что иногда частоты встречаемости определенных аллелей SSR-локусов очень малы, что позволяет считать эти аллели редкими и даже уникальными, что отражается в формуле паспорта [12]. В случае обнаружения единичных растений-носителей этих уникальных аллелей в исследуемой маркируемой популяции свеклы, представляется целесообразным проведение у них анализа вариантов мт генов *atpB* и *atpA* и установления принадлежности этих растений либо к искомой популяции с известным типом

цитоплазмы, либо к привнесенным извне «генетическим загрязнениям».

Важно отметить, что в изученных предложенным методом популяциях селекционных линий и гибридов сахарной свеклы наблюдалось все возможное разнообразие вариантов генов *atpB* и *atpA* и гетероплазмия, т.е. метод оказался информативным. Определение типов цитоплазм у сахарной свеклы в публикациях последних лет происходило с использованием и других молекулярных маркеров – специфических рамок считывания, (например, *orf-B*, *rps4*, входящих в состав обоих типов цитоплазмы, *orf324*, S-RAPD, специфичных для мт ДНК S-типа и *orf246*, специфичной для мт ДНК N-типа), гена *coxII*, минисателлитов [10, 13–15]. Эти работы были посвящены решению конкретных задач по установлению копийности маркерных последовательностей, подтверждению явления гетероплазмии у фертильных растений, детальной характеристике множественных вариантов S- и N-цитоплазм с помощью ПЦР в реальном времени у этой сельскохозяйственной культуры, но использованный нами метод был прост и надежен для разделения стерильных растений от фертильных на ранних этапах формирования свекольного растения, что было важно для программ селекции, а также способствовал разрешению спорных моментов при составлении молекулярно-генетических паспортов коммерческих гибридов сахарной свеклы, закупаемых хозяйствами Республики. Такие исследования с целью скрининга селекционного материала сахарной свеклы были проведены в стране впервые.

Список использованной литературы

1. Bosemark, N.O. Genetics and Breeding / N.O. Bosemark // The sugarbeet crop / D.A. Cooke and R.K. Scott (Eds.). – London: Chapman and Hall, 1993. – P. 66–119.
2. Вепрев, С.Г. Изменение типа цитоплазмы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) при инбридинге: влияние гибридизации / С.Г. Вепрев, И.Б. Хворостов, Г.М. Дымшиц // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 6. – С. 796–804.
3. Molecular mapping of a fertility restorer gene for Owen cytoplasmic male sterility in sugar beet / E. Hagihara [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2005. – Vol. 111. – P. 250–255.
4. Изменение типа цитоплазмы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) при инбридинге. I. Гибридологический анализ и тестирование типа митохондриальной ДНК / С.Г. Вепрев [и др.] // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 7. – С. 934–942.
5. ПЦР-анализ конверсии N-типа цитоплазмы в S-тип у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) / И.П. Хворостов [и др.] // Доклады АН. – 1997. – Т. 357, № 4. – С. 572–574.
6. Svirshchevskaya, A.M. Production and Performance of Gynogenetic Sugarbeet lines / A.M. Svirshchevskaya, J. Dolezel // J. of Sugar

Beet Research (USA). – October-December, 2000. – Vol. 37, N 4. – P. 117–133.

7. Plaschke, J. Detection of genetic diversity in closely related wheat using microsatellite markers / J. Plaschke, M.W. Ganai, M.S. Roder // *Theor. Appl. Genet.* – 1995. – V. 91. – P. 1001–1007.

8. Kmiec, B. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals / B. Kmiec, M. Woloszynska, H. Janska // *Curr. Genet.* – 2006. – V. 50. – P. 149–159.

9. The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in content of expressed ORFs / M. Satoh [et al.] // *Mol. Gen. Genomics.* – 2004. – V. 272. – P. 247–256.

10. Брагин, А.Г. Оценка стехиометрии маркерных последовательностей митохондриального генома сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) методом ПЦР в реальном времени / А.Г. Брагин, М.К. Иванов, Г.М. Дымщиц // Доклады АН. – 2006. – Т. 406. – Вып. 2. – С. 260–265.

11. Свирицевская, А.М. Гинонез *in vitro*: создание и изучение коллекции линий сахарной свеклы / А.М. Свирицевская [и др.] // Молекулярные механизмы генетических

процессов и биотехнология: матер. Междунар. симпозиума, Москва, 18–21 ноября 2001 г., Минск, 22–24 ноября 2001 г. – М., 2001. – С. 417–418.

12. Микросателлитный анализ линейного материала сахарной свеклы / А.М. Свирицевская [и др.]. // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: материалы Междунар. науч. конф., 3–6 дек. 2008 г., г. Минск / редкол.: Н.П. Максимова [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2008. – С. 160–162.

13. The distribution of normal and male sterile cytoplasms in Chinese sugar-beet germplasm / D. Cheng [et al.] // *Euphytica.* – 2009. – V. 165. – P. 345–351.

14. Анализ гетероплазматического состояния митохондриальной ДНК фертильных и мужскостерильных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) / А.Г. Брагин [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15, № 3. – С. 524–530.

15. Mitochondrial genome diversity in *Beta vulgaris* L.ssp.vulgaris (Leaf and Garden Beet Groups) and its implications concerning the dissemination of the crop / D. Cheng [et al.] // *Genet. Resour. Crop Evol.* – 2011. – Vol. 58. – P. 553–560.

Дата поступления статьи 20 августа 2013 г.

Е.А. Волуевич

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

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

Введение

Пшеница – важная продовольственная культура мира, обеспечивающая 20% энергетических потребностей в рационе человечества [1] и занимающая свыше 200 миллионов гектаров [2]. Ржавчинные болезни пшеницы – наиболее важные биотические факторы, ограничивающие производство зерна во всем мире. Стеблевая ржавчина пшеницы является опасной болезнью. При сильном поражении посевов снижение урожая зерна может составлять 100% [3].

Для предотвращения глобального кризиса в производстве зерна пшеницы FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций) предпринимает всеобщие действия через WRDGP (Wheat Rust Disease Global Program, Глобальная программа по ржавчинным болезням пшеницы). Главной целью этой программы является предотвращение и управление появлением ржавчинных болезней пшеницы и увеличение продуктивности этой культуры. В WRDGP сотрудничают страны - члены FAO во взаимодействии с BGRI (Borlaug Global Rust Initiative, Глобальная инициатива Борлауга по ржавчине). Инициатива была создана в 2005 году вначале как GRI (Global Rust Initiative, Глобальная инициатива по ржавчине). В дальнейшем она стала известна как BGRI. Инициатива включает ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Международный центр сельскохозяйственных исследований в засушливых районах), CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, International Maize and Wheat Improvement Center, Международный Центр улучшения кукурузы и пшеницы), Cornell University (Корнелльский университет) и FAO как постоянных членов. Главной целью BGRI является

систематическое уменьшение мировой уязвимости пшеницы стеблевой, желтой и листовой (бурой) ржавчиной через пропаганду и содействие развитию устойчивой международной системы, чтобы консолидировать усилия для сдерживания глобальных угроз от этих болезней и противостоять им в будущем. WRDGP выполняется не только в тесном сотрудничестве с международными сельскохозяйственными научно-исследовательскими центрами и другими международными институтами, но и в сотрудничестве с национальными правительствами стран. FAO координирует также GCRMS (Global Cereal Rust Monitoring System, Глобальная система мониторинга ржавчины зерновых), основные элементы которой связаны с недавно появившейся высоко агрессивной расой Ug99 возбудителя стеблевой ржавчины и описаны Hodson с соавторами [4]. Предполагается, что через несколько лет страны Ближнего Востока, Восточной и Северной Африки, Центральной и Южной Азии, культивирующие около 80 миллионов га пшеницы (FAOSTAT 2007), будут страдать от Ug99 [2]. В WRDGP недавно были включены многие страны, которые классифицированы на 4 категории по риску от расы Ug99. К первой категории отнесены уже пострадавшие от Ug99 страны: Кения, Уганда, Эфиопия, Судан, Йемен, Танзания, Зимбабве, Южная Африка, Иран. Ко второй категории - государства с непосредственным риском от Ug99: Эритрея, Ирак, Оман, Афганистан, Пакистан. К третьей категории – страны с высоким риском от этой расы: Египет, Иордания, Ливан, Сирия, Турция, Индия, Армения, Азербайджан, Грузия, Казахстан, Кыргызстан, Таджикистан, Туркменистан, Узбекистан. К четвертой категории отнесены подверженные риску от Ug99 страны: Алжир, Ливия, Марокко, Тунис.

В Республике Беларусь развитие стеблевой ржавчины периодически наблюдается в отдельных районах страны [5], тем не менее, селекция пшеницы на устойчивость к этой болезни в настоящее время не ведется. Однако сорта должны иметь генетическую устойчивость к этой болезни. Выведение устойчивых к ржавчине сортов является единственным экологически приемлемым способом защиты

растений. Популяция возбудителя стеблевой ржавчины по признаку вирулентности в Республике Беларусь также пока не исследовалась. В настоящее время для проведения такого мониторинга в лаборатории генетики фитоиммунитета ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» сформирована коллекция *Sr*-тестеров благодаря сотрудничеству с российскими и казахскими учеными.

Биологические особенности возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы

Возбудитель стеблевой (черной) ржавчины – биотрофный грибной патоген *Puccinia graminis* Pers. (синоним *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) относится к классу *Basidiomycetes*, подклассу *Teliomycetidae*, порядку *Uredinales*, семейству *Pucciniaceae*. Гриб имеет пять следующих друг за другом спороношений. На растении-промежуточнике образуются спермогонии (пикниды) с развивающимися в них спермациями (пикноспорами) и эции с эциоспорами, которые затем заражают пшеницу. На растении-хозяине формируются урединии с урединиоспорами. На стерне образуются телии с телиоспорами, прорастающие весной с образованием базидий с базидиоспорами, которые затем переносятся на промежуточник.

Урединиопустулы обычно имеют овальную форму и формируются на листовых влагалищах, стеблях и колосьях, на листьях они образуются с обеих сторон. В них созревают кирпично-красные урединиоспоры, которые при разрыве эпидермиса разносятся ветром на большие расстояния. Показано, что стеблевая ржавчина в 1983 году продвигалась с юга на север со скоростью около 54 км за 2,4 часа, и самый длинный хорошо зарегистрированный скачок урединиоспор *P. graminis* f. sp. *tritici* составил около 680 км между двумя выращиваемыми пшеницу регионами в Канаде, разделенными лесами и озерами [6, 7]. Урединиоспоры передвигаются на большой высоте (до 3000 м) в виде облака, следуя траектории воздушных масс, их осаждение происходит вследствие дождя. Споры также непосредственно распространяются с брызгами дождя на небольшие расстояния. Урединиоспоры проникают в растения через устьица. Эциоспоры образуются в результате полового процесса, происходящего на растениях-промежуточниках: барбарисе *Berberis vulgaris* L. и *Mahonia* ssp. Виды маго-

нии были важным источником инфекции в Европе и Северной Америке. Зимует грибок в виде мицелия или урединий на самосейках пшеницы и озимых посевах, а также в виде телий с телиоспорами. Возбудитель стеблевой ржавчины является полициклическим (макроциклическим) патогеном [8]. Он формирует эпифитотии посредством повторяющихся циклов бесполого размножения урединиоспорами. При повышении температуры и старении растения-хозяина начинается образование телий, а бесполое размножение уменьшается и затем прекращается.

Для *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* частота мутаций на одно урединиальное поколение составляет $8,3 \times 10^{-6}$ для гетерозиготного локуса и $6,9 \times 10^{-11}$ для гомозиготного локуса авирулентности [9]. В связи с этим считается, что обусловленная одним главным геном устойчивость сорта может преодолеваться в течение 3–4 лет его возделывания на больших площадях. Однако при исследовании динамики вирулентности возбудителя стеблевой ржавчины в Кении в течение 14-летнего периода (1957-1971 гг.) было показано, что вирулентность этого патогена к генотипу растения-хозяина может возникать не так быстро [10]. В частности, ген устойчивости *Sr31* (*Sr* – stem rust, стеблевая ржавчина) использовали для генетической защиты пшеницы от стеблевой ржавчины в течение 40 лет, пока в 1998 году в Республике Уганда не появилась преодолевающая его высоко агрессивная раса Ug99 [11]. Этот интрогрессированный от ржи ген присутствует в виде транслокации T1BL.1RS в европейских озимых сортах пшеницы и в яровых сортах, выведенных CIMMYT и ICARDA. Транслокацию T1BL.1RS также широко использовали в китайские селекционеры. Различия в длительности эффективности генов устойчивости обусловлены тем, что частота мутаций варьирует в зависимости от гена авирулентности [12].

Стратегии селекции на устойчивость

Для генетической защиты сортов пшеницы от стеблевой ржавчины используют главные и малые гены устойчивости. Наиболее часто в селекции применяют главные гены, особенно те, к которым разработаны молекулярные маркеры. Ювенильные (проростковые) гены, функционирующие на протяжении всего онтогенеза растения, обычно расоспецифические и обуславливают полную устойчивость к некоторым расам гриба. Возрастные (APR – adult plant resistance) гены контролируют частичную, неполную устойчивость, которая проявляется на флаговом (и подфлаговом) листе в виде медленного развития болезни. Стратегия селекции сортов на частичную устойчивость может быть основана на отборе генотипов с длинным латентным периодом, что позволяет задерживать эпифитотийное развитие болезни. Желательно, чтобы гены медленного развития ржавчины обуславливали длительную устойчивость, что возможно в том случае, если они не являются расоспецифическими. Неполная устойчивость, ассоциированная с частой невозможностью формирования гаусторий, также является источником длительной устойчивости [12]. Предложены и стратегии селекции, основанные на пирамидировании нескольких эффективных ювенильных генов устойчивости в одном сорте и их сочетании с возрастными генами устойчивости.

Для достижения долговременного контроля над расой Ug99 и другими патотипами возбудителя стеблевой ржавчины в CIMMYT создают сорта мягкой яровой пшеницы с длительной, нерасоспецифической, возрастной (APR) устойчивостью, обуславливаемой многими малыми генами [14]. Приемлемый уровень полигенной устойчивости к стеблевой ржавчине достигается путем аккумуляции приблизительно пяти малых генов устойчивости [15, 16].

Для успешной селекции большое значение имеет выявление источников устойчивости на основе проведения регулярных оценок к болезни. Многие страны тестируют свои сорта и селекционный материал к расе Ug99 и ее вариантам в международных питомниках, созданных в Нджоро (Njoro, Кения) для мягкой пшеницы и в Дебра Зейт (Debra Zeit, Эфиопия) для твердой пшеницы [2].

В 2000 году в США (Castroville, Техас) был создан питомник для скрининга на устойчивость селекционного материала пшеницы к листовой, стеблевой, желтой ржавчине и овса к корончатой и стеблевой ржавчине. Кроме того, в этом питомнике оценивается гермоплазма из CIMMYT, чтобы выявлять ценные источники для использования в селекции пшеницы в США. Этот питомник находится на переднем пути миграции ржавчины в США [17]. Он является «горячей точкой» для возбудителей ржавчины и необходим американским селекционерам для оценки сортообразцов с целью предупреждения потери устойчивости основными возделываемыми сортами пшеницы. С 2005 года в Кении проводят оценку старых и современных канадских сортов на устойчивость к расе Ug99 и ее вариантам, которые преодолели многие главные и широко использованные гены резистентности, что вызвало серьезную обеспокоенность в связи с уязвимостью канадской пшеничной культуры.

В Грузии сорта оценивают в Кавказском региональном питомнике озимой пшеницы, также их передают в Кению для выявления устойчивой гермоплазмы к расе Ug99 [18]. Ржавчинный питомник-ловушку имеет Казахстан. Россия передает свой ценный материал для оценки на устойчивость к вредоносной расе стеблевой ржавчины Ug99 и ее вариантам в международный питомник KARI (Kenya Agricultural Research Institute, Кенийский институт сельскохозяйственных исследований, Нджоро) [19]. Для оценки к Ug99 в Кению передают свою гермоплазму Казахстан [20] и Таджикистан [21]. Поскольку занос стеблевой ржавчины в Западную Сибирь возможен через Казахстан, в 1998 году селекционные программы Западной Сибири и Казахстана были объединены в Казахстанско-Сибирскую сеть улучшения яровой пшеницы (КАСИБ), в состав которой вошли семь научных учреждений РФ и десять учреждений Казахстана [22]. Каждое учреждение раз в два года предоставляет в КАСИБ 2–4 лучших сортообразца для изучения в контрастных условиях Мексики, Кении и Западной Сибири. Кроме того, в CIMMYT (Обрегон, Мексика) проводят скрещивания с лучшими адаптивными сортами из Казахстана и Западной Сибири, выделенными

по данным 2-х летнего испытания, а затем отбор полученного материала на устойчивость к стеблевой ржавчине и другим болезням с использованием методологии ведения члночной селекции. Обмен материалом между СИММУТ, научными учреждениями Казахста-

на и Западной Сибири позволяет вовлекать в гибридизацию новые перспективные источники хозяйственно ценных признаков из мирового генофонда и создавать сорта яровой пшеницы с долговременной устойчивостью к болезням [22].

Гены устойчивости и их эффективность

Для использования в селекции известных главных генов устойчивости важно знать их эффективность к популяции патогена. В этой связи большое значение приобретает мониторинг генов вирулентности, который позволяет предсказать эффективность генов резистентности во времени и пространстве и является основой опережающей селекции на устойчивость.

Раса Ug99 преодолела устойчивость, обусловливаемую большинством *Sr*-генов пшеничного происхождения. Первоначально выделенная как преодолевающая ген *Sr31* она представлена сейчас 7 вариантами (патотипами) в зависимости от наличия генов вирулентности к генам устойчивости: ТТКСК (к генам *Sr31*, *Sr2*), ТТКСФ (к гену *Sr21*), ТТКСР (к генам *Sr21*, *Sr24*), ТТКСТ (к генам *Sr31*, *Sr24*, *Sr2*), ТТТСК (к генам *Sr31*, *Sr2*, *Sr36*), РТКСК (к гену *Sr31*), РТКСТ (к генам *Sr31*, *Sr24*) согласно североамериканской системе номенклатуры стеблевой ржавчины (North American stem rust nomenclature system) [23–25]. Появившиеся варианты Ug99 с добавленной вирулентностью к генам *Sr24* (ТТКСТ) и *Sr36* (ТТТСК) привели к потере устойчивости более чем у половины ранее резистентного материала [26]. Произошло и преодоление гена *Sr38*, который начали сравнительно недавно использовать в ряде европейских и австралийских сортов и некоторой части новой гермоплазмы СИММУТ [27]. Раса Ug99 уже встречается во многих странах мира и ожидается ее дальнейшее распространение с господствующими ветрами в другие государства Африки, Азии и далее [27].

Используя члночную (шаттл) стратегию селекции (Мексика – Кения) было установлено, что оцениваемые в Кении линии СИММУТ с хорошим уровнем устойчивости имеют ген *Sr2* медленного развития ржавчины, который является важным компонентом комплекса возрастной устойчивости, обычно называемый «*Sr2*-комплекс». О генах, вовлеченных в

«*Sr2*-комплекс», и их взаимодействии пока известно немного. Однако ряд работ указывает на то, что в таких случаях скорость развития ржавчины контролируется как каждым малым геном, так и их взаимодействием [15, 16, 28].

Ген *Sr2* рецессивный, он был перенесен в сорта мягкой пшеницы Норе и Thatcher от ярославского эммера, а в сорт Khapstein – от Khapli эммера. Комбинации гена *Sr2* с другими пока неизвестными генами медленного развития ржавчины, вероятно, происходящими от Thatcher («*Sr2*-комплекс»), обеспечивают основу длительной устойчивости к стеблевой ржавчине в гермоплазме Миннесотского университета (США), Сиднейского университета (Австралия) и яровой пшеницы, полученной Н.Е. Борлаугом (СИММУТ, Мексика). Некоторый лучший материал СИММУТ с APR, например, линии пшеницы Kingbird, Pavon F76, Kiritati, сохраняет высокий адекватный уровень возрастной устойчивости за счет гена *Sr2*. В Австралии сорт Warigo, имеющий рецессивные гены устойчивости *Sr2* и *Sr17*, был устойчив к стеблевой ржавчине в течение 16 лет (1943–1959 гг.) [29].

Ген *Sr2* является одним из наиболее широко используемых генов в селекционных программах всего мира. Он обеспечивал длительную возрастную устойчивость к ржавчине в течение 50 лет [30]. Однако некоторые сорта с этим геном стали сильно поражаться стеблевой ржавчиной в связи с появлением новой расы 15В. Другие сорта, например, Kenya Page и Africa Mayo, характеризовались длительной устойчивостью. Длительная устойчивость к стеблевой ржавчине сорта Selkirk, имеющего комплекс генов *Sr2+Sr6+Sr7b+Sr9d+Sr17+Sr23*, обусловлена определенным вкладом каждого из этих генов, но наиболее важный эффект может вносить ген *Sr2*. В Австралии в полевых условиях долгое время были устойчивы широко возделываемые сорта Timgalen, Timson, Cook, Shortim, содержащие комплекс генов

Sr5+Sr6+Sr8+Sr6. Каждый из этих генов является расоспецифическим и по отдельности не обеспечивает длительную устойчивость. Также эти гены не обеспечивают устойчивость, если сочетаются с иными генами.

Устойчивость канадских яровых сортов мягкой пшеницы тоже может быть обусловлена геном *Sr2* [31, 32]. Хорошую устойчивость имеют сорт AC Cadillac, который содержит ген устойчивости *SrCad*, и сорт Pease, ген устойчивости у которого определен с помощью молекулярного картирования в том же интервале, что и ген *SrCad*. Кроме того, сорт Pease содержит ген устойчивости к листовой ржавчине *Lr34* (*Lr* – leaf rust) [33], который, как известно, обеспечивает или усиливает устойчивость ко всем трем видам ржавчины пшеницы. Первоначально ген *Lr34* был идентифицирован как ген устойчивости пшеницы к листовой ржавчине [34]. Позднее сообщалось о том, что *Lr34* также обеспечивает возрастную устойчивость к желтой [35] и стеблевой ржавчине [36]. При сочетании гена *SrCad* с геном *Lr34* наблюдается высокий уровень устойчивости к Ug99, тогда как в отсутствие *Lr34* ген *SrCad* обуславливает только умеренную устойчивость к этой расе стеблевой ржавчины [37]. Лocus *Lr34/Yr18/Pm38/Bdv1/Ltn1* (*Yr* – yellow rust, желтая ржавчина; *Pm* – powdery mildew, мучнистая роса; *Bdv* – barley yellow dwarf virus, вирус желтой карликовости ячменя; *Ltn* – leaf tip necrosis, некроз верхушки листа) обуславливает длительную частичную устойчивость к ряду болезней и широко используется в селекционных программах по всему миру [38]. На взаимодействие гена *Sr2* с другими генами, усиливающими возрастную устойчивость пшеницы к стеблевой ржавчине, указывали Singh с соавторами [14], а с геном *Lr34* – Kolmer с соавторами [39]. В недавнем исследовании было показано, что молекулярный маркер, сцепленный с геном *Lr34*, в значительной степени ассоциирован с устойчивостью к расе Ug99 и взаимодействовал с локусами устойчивости, расположенными в хромосомах 2B и 6B [40]. Устойчивость канадских сортов твердой пшеницы к стеблевой ржавчине обусловлена пирамидой генов (*Sr9e+Sr13+Sr14+Sr22*) и отсутствием у них D-гена, в котором находятся гены-ингибиторы устойчивости [41].

К стеблевой ржавчине эффективными являются гены *Sr22*, *Sr26*, *Sr35* и продолжает оставаться эффективной к Ug99 и ее вариантам комбинация генов *Sr24+Sr36* [42]. В Австралии ген *Sr26* эффективен уже более 30 лет, поэтому успешно используется в селекции, несмотря на то, что чужеродный сегмент с этим геном снижает урожай на 9% [27, 43]. В США успешно применяют ген *Sr28*, вносящий вклад в возрастную устойчивость, и ген устойчивости к стеблевой ржавчине, имеющийся у сорта Gabo 56. Пирамидирование генов, в том числе *Sr28* и *SrGabo 56*, дает более длительную устойчивость [44, 45]. В Венгрии пока эффективны гены *Sr27*, *Sr31* и *Sr36* [46]. По данным Purnhauser с соавторами, ген *Sr31* содержат 24,1% сортов, а *Sr36* – 15,9%, в том числе 32,1% и 18,0% местных сортообразцов соответственно [47]. Мониторинг вирулентности популяции возбудителя стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* Pers. в Северо-Кавказском регионе РФ показал отсутствие генотипов гриба с генами вирулентности, комплементарными к генам устойчивости *Sr5*, *Sr9e*, *Sr11*, *Sr13*, *Sr25*, *Sr31*, *Sr35*, *SrWLD* [48, 49]. В южных районах Грузии, где стеблевая ржавчина наблюдается ежегодно, эффективными являются гены *Sr13*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr27*, *Sr31*, *Sr36* [18].

Во всех зонах распространения расы Ug99 эффективен ген *Sr25*, но он контролирует высокий уровень устойчивости к стеблевой ржавчине только на определенном генетическом фоне, особенно в присутствии возрастного гена *Sr2* [14, 27]. Недавно *Sr25* был идентифицирован в российском сорте озимой мягкой пшеницы Паллада [50].

В селекционные линии CIMMYT включены эффективные гены *Sr25*, *Sr1A.1R^{Amigo}* (Amigo), *SrTmp* (Triumph 64), *SrSynt* (Synthetic wheat, возможно, *Sr33* или *Sr45*), *SrSha7* (Shanghai 7), *SrND643* (ND643) [42], *SrHUW234* (HUW234)+*Lr34* [14], *Sr45* и *SrNing* (Ning) [26].

Ген *Sr1RS^{Amigo}* (*Sr1AR*, *Sr1A.1R*) локализован в ржаной транслокации T1AL.1RS у сорта пшеницы Amigo и эффективен к расе Ug99 [51, 52]. T1AL.1RS является второй после T1BL.1RS широко распространенной транслокацией в коммерческих сортах [53]. В Amigo она передана от аргентинского сорта ржи Insave через октоплоидное тритикале Gaucho. В связи с

угрозой распространения Ug99, важным является идентификация материала пшеницы с генами устойчивости к этой расе, в том числе идентификация сортов с ржаной транслокацией T1AL.1RS. Sozinov с соавторами использовали в качестве генетического маркера этой транслокации биохимический маркер запасного белка зерна – секалин *Gli-Alw* (GLD 1A17) [54]. Ген *Sr1A.1R^{Amigo}* представлен в американских озимых сортах Amigo, TAM107, TAM200, Nekota, Prairie Red и в некоторых линиях яровой пшеницы селекции CIMMYT, куда привнесен в результате скрещивания с TAM200 [27].

Бабаянц с соавторами отмечают, что на Украине к стеблевой ржавчине эффективен ген *SrR* (*Sr50*) [55], который был привнесен от сорта ржи Imperial в хромосомы 1B и 1D пшеницы [56], и эффективен к расе Ug99, так как исходная линия TAF 2 с этим геном устойчива [27]. В Селекционно-генетическом институте (Национальном центре семеноведения и сортоизучения НААН Украины, Одесса) созданы линии пшеницы с генетическим материалом от *Aegilops cylindrica*, *Triticum erebuni* и Амфидиплоида 4 (*Triticum dicoccoides* × *Triticum tauschii*), в которых выявлены новые эффективные гены устойчивости к стеблевой ржавчине *SrAc1*, *SrAc2*; *SrTe1*, *SrTe2*; *SrAd1*, *SrAd2* соответственно [55].

По данным Pumphrey с соавторами, эффективными к расе Ug99 являются интрогрессивные гены *Sr32*, *Sr37*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr43*, *Sr44*, *Sr47*, *SrTt3*, *Sr2S#1*, *SrAsp5*, *SrAse*, *SrAeg5* и *SrHv6* [57]. Согласно другим исследованиям, к этой расе эффективны гены *Sr28*, *Sr29*, *SrTmp* от *Triticum aestivum*; *Sr2*, *Sr13*, *Sr14* от *T. turgidum*; *Sr22*, *Sr35* от *T. monococcum*; *Sr37* от *T. timopheevii*; *Sr32*, *Sr39* от *Aegilops speltoides*;

Sr33, *Sr45*, *Sr46* от *Ae. tauschii*; *Sr40* от *T. araraticum*; *Sr25*, *Sr26*, *Sr43* от *Thinopyrum elongatum*; *Sr44* от *Th. intermedium*; *Sr27*, *Sr50* и *Sr1A/1R* от *Secale cereale* [58, 59]. Превосходным источником *Sr*-генов устойчивости пшеницы к стеблевой ржавчине может являться и тритикале, так как в резистентных на стадии проростка линиях этой культуры были идентифицированы гены ржаного генома *Sr27* и *SrSatu* [60].

Эффективными против всех рас стеблевой ржавчины в настоящее время являются гены *Sr22*, *Sr35*, *Sr26*, *Sr50*, и они не сцеплены с нежелательными агрономическими признаками [61]. Против всех рас стеблевой ржавчины эффективны также гены *Sr32*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr43*, но они сцеплены с некоторыми признаками, ухудшающими хозяйственные показатели. Гены *Sr13*, *Sr14*, *Sr25*, *Sr27*, *Sr28*, *Sr45*, *SrTmp*, *Sr1A.1R* эффективны против всех вариантов расы Ug99, но не эффективны к ряду других рас этого патогена. Отдельные эффективные только к некоторым расам гены имеют высокую селекционную ценность (например, *Sr36/Pm6*) и могут использоваться в комбинации с другими *Sr*-генами. Эффективность и агрономическая ценность генов *Sr46*, *Sr47*, *Sr51*, *Sr52*, *Sr53*, *SrCad*, *SrWeb* еще изучается.

В некоторой мере защитить глобальное производство пшеницы за счет уменьшения уровня инокулюма расы Ug99 и, следовательно, сдерживания распространения инфекции по прогнозированному миграционному пути позволит создание устойчивых к этой расе сортов для возделывания в Кении [62] и других странах, из которых осуществляется миграция спор гриба. В Кении сейчас эффективны источники с генами устойчивости *Sr2*, *Sr24*, *Sr38* в комбинации [63].

Заключение

Лучшей стратегией селекции является использование в скрещиваниях источников, обладающих приемлемыми уровнями устойчивости ко многим болезням в сочетании с высокой продуктивностью, качеством зерна, устойчивостью к абиотическим стрессам и т.д. Для улучшения единичных признаков (в том числе устойчивости к стеблевой ржавчине) предпочтительно проводить скрещивания с донорами тех генов устойчивости, для которых разработаны молекулярные маркеры.

В качестве сортов-реципиентов лучше использовать адаптированные районированные сорта, а при оценке беккроссных поколений отбирать растения, наиболее приближенные к сорту-реципиенту по фенотипу и обладающие целевым геном от сорта-донора. Маркер-сопутствующее беккроссирование при использовании достаточного количества маркеров, равномерно распределенных по всем хромосомам генома, позволяет быстро получить замещение генома донора геномом реципиента

[64]. Особенно незаменимо использование молекулярных маркеров для комбинирования в одном сорте нескольких генов устойчивости (пирамидирования). Молекулярные маркеры широко используются селекционерами в странах Европейского Союза, США, Китае, Японии, Австралии и др. Маркер-сопутствующая

селекция должна применяться и в Республике Беларусь. Также в связи с непрерывным реассортиментным процессом в популяции патогена необходимо проведение мониторинга по признаку вирулентности для прогноза использования генов устойчивости в селекционных программах.

Список использованных источников

1. Филипс, С. Производство зерна пшеницы и применение минеральных удобрений в мире / С. Филипс, Р. Нортон // Питание растений. – 2012. – № 4. – С. 2–5.
2. El Khoury, W.E. The UN-FAO Wheat Rust Disease Global Program / W.E. El Khoury // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 213–220.
3. Genetic improvement of wheat resistance to dangerous races of stem rust using conventional and molecular techniques through international cooperation / A. Kokhmetova [et al.] // 8th Int. Wheat Conference: Abstracts of oral and poster presentations, St. Peterburg 1–4 June 2010. – St. Peterburg, 2010. – P. 274–275.
4. Hodson, D.P. Climate change: what future for wheat? / D.P. Hodson, J.W. White // Wheat facts and futures; ed. J. Dixon, H.-J. Braun, P. Kosina, J. Crouch. – CIMMYT, Mexico D.F.: Mexico. – 2009. – P. 52–61.
5. Будевич, Г.В., Волуевич, Е.А. Вредоносность стеблевой ржавчины озимой пшеницы / Г.В. Будевич, Е.А. Волуевич // Ботаника. – Вып. XXI. – Минск, 1979. – С. 171–174.
6. Roelfs, A.P. Wheat and rye stem rust / A.P. Roelfs // The Cereal Rusts. Vol. 2. Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control; ed. A.P. Roelfs, W.R. Bushnell. – Orlando: Academic Press. – 1985a. – P. 1–37.
7. Roelfs, A.P. Epidemiology in North America / A.P. Roelfs // The Cereal Rusts. Vol. 2. Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control; ed. A.P. Roelfs, W.R. Bushnell. – Orlando: Academic Press. – 1985b. – P. 403–434.
8. Hau, B. Wind-dispersed diseases / B. Hau, C. de Vallavieille-Pope // The Epidemiology of Plant Diseases; ed. B.M. Cooke, D.G. Jones, B. Kaye. – The Netherlands: Springer. – 2006. – P. 387–416.
9. Schafer, J.F. Estimated relation between numbers of urediniospores of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and rates of occurrence of virulence / J.F. Schafer, A.P. Roelfs // Phytopathology. – 1985. – Vol. 75. – P. 749–750.
10. Martens, J.W. Virulence dynamics in the wheat stem rust population of Kenya / J.W. Martens // Plant Dis Repr. – 1975. – Vol. 59. – P. 763–767.
11. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda / Z.A. Pretorius [et al.] // Plant Disease. – 2000. – Vol. 84. – P. 203.
12. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes / J.E. Leach [et al.] // Annual Review of Phytopathology. – 2001. – Vol. 39. – P. 187–224.
13. Nicks, R.E. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialized fungal pathogens / R.E. Nicks, D. Rubiales // Euphytica. – 2002. – Vol. 124, № 2. – P. 201–216.
14. Breeding for minor gene-based adult plant resistance to stem rust in wheat / R.P. Singh [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 131–139.
15. Knott, D.R. Multigenic inheritance of stem rust resistance in wheat // Crop Science. – 1982. – Vol. 22, Issue 2. – P. 393–399.
16. Knott, D.R. Using polygenic resistance to breed for stem rust resistance in wheat / D.R. Knott // Breeding strategies for resistance to the rust of wheat; ed. N.W. Simmonds, S. Rajaram. – CIMMYT, Mexico D.F.: Mexico. – 1988. – P. 39–47.
17. The multi-state rust screening nursery at Castroville, Texas, U.S.A. / A.M.H. Ibrahim [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 254.
18. Screening wheat germplasm for resistance to stem rust in Georgia / Z. Sikharulidze [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 256–257.

19. Оценка набора интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы селекции НИИСХИ Юго-Востока на устойчивость к расе стеблевой ржавчины Ug99+Sr24 (ТТКСТ) / С.Н. Сибикеев [и др.] // Док. Рос. акад. с-х. наук. – 2011. – № 2. – С. 3–5.
20. Identification of Stem rust resistance germplasm in Kazakhstan / А.М. Kokhmetova [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 258.
21. Breeding Rust Resistant Wheat Varieties in Tajikistan / M. Rahmatov [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 258.
22. Селекционно-генетическая оценка популяций яровой мягкой пшеницы сибирского питомника челночной селекции СИММИТ / П. Шаманин [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 21–32.
23. Virulence variation within the Ug99 lineage / Y. Jin [et al.] // Proc. 11th Int. Wheat Genet. Symp. – Brisbane, Australia. – 2008. – P. 1–3.
24. First report of a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* race virulent to the *Sr24* and *Sr31* wheat stem rust resistance genes in South Africa / Z.A. Pretorius [et al.] // Plant Disease. – 2010. – Vol. 94. – P. 1163.
25. International surveillance of wheat rust pathogens: progress and challenges / R. Park [et al.] // Euphytica. – 2011. – Vol. 179. – P. 109–117.
26. Mapping of Ug99 effective stem rust resistance genes *Sr45* and *SrNing* on chromosomes 1DS and 4BL in CIMMYT wheat germplasm / S. Bhavani [et al.] // 8th Int. Wheat Conference: Abstracts of oral and poster presentations, St. Petersburg 1–4 June 2010. – St. Petersburg, 2010. – P. 231.
27. Will stem rust destroy the world's wheat crop? / R.P. Singh [et al.] // Advances in Agronomy. – 2008a. – Vol. 98. – P. 271–309.
28. Wheat rust in Asia: meeting the challenges with old and new technologies / R.P. Singh [et al.] // New directions for a diverse planet: Proc. 4th Int. Crop Sci. Cong. – Brisbane, Australia. – 2004. – P. 1–13.
29. Park, R.F. Stem rust of wheat in Australia / R.F. Park // Australian Journal of Agricultural Research. – 2007. – Vol. 58. – P. 558–566.
30. McIntosh, R.A. Wheat rusts: an atlas of resistance genes / R.A. McIntosh, C.R. Wellings, R.F. Park; ed. A. Cloud-Guest. – Victoria, Australia: CSIRO Publications, 1995. – 200 p.
31. Sources of resistance to stem rust race Ug99 and its variants in Canadian wheat germplasm / R.M. DePauw [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 171–178.
32. Resistance to stem rust race Ug99 in the Canadian spring wheat cultivar 'Peace' / G. Humphreys [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 253.
33. Fine scale genetic and physical mapping using interstitial deletion mutants of *Lr34/Yr18*: a disease resistance locus effective against multiple pathogens in wheat / W. Spielmeier [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – Vol. 116, № 4. – P. 481–490.
34. Dyck, P.L. The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat / P.L. Dyck // Genome. – 1987. – Vol. 29. – P. 467–469.
35. Singh, R.P. Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat / R.P. Singh // Phytopathology. – 1992. – Vol. 32. – P. 335–338.
36. Kerber, E.R. Leaf rust resistance gene associated with nonsuppression of stem rust resistance in wheat cultivar Canthatch / E.R. Kerber, T. Aung // Phytopathology. – 1999. – Vol. 89. – P. 518–521.
37. Genetics and mapping of seedling resistance to Ug99 stem rust in Canadian wheat cultivars 'Peace' and 'AC Cadillac' / C. Hieber [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2011. – Vol. 122. – P. 143–149.
38. Functional markers in wheat: current status and future prospects / Y. Liu [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – Vol. 125, № 1. – P. 1–10.
39. Expression of a Thatcher wheat adult plant stem rust resistance QTL on chromosome arm 2BL is enhanced by *Lr34* / J.A. Kolmer [et al.] // Crop Science. – 2011. – Vol. 51, № 2. – P. 526–533.
40. Identification of Ug99 stem rust resistance loci in winter wheat germplasm using genome-wide association analysis / L.-X. Yu [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – The online version of this Article DOI 10.1007/s00122-012-1867-x

41. Kerber, E.R. Suppression of stem rust resistance in the hexaploid wheat cv. Canthatch by chromosome 7DL / E.R. Kerber, G.J. Green // Canadian Journal of Botany. – 1980. – Vol. 58, № 12. – P. 1347–1350.
42. Current resistance sources and breeding strategies to mitigate Ug99 threat / R.P. Singh [et al.] // Proc. 11th Int. Wheat Genet. Symp. – Brisbane, Australia. – 2008b. – P. 1–3.
43. Grain yields of near isogenic lines with added genes for stem rust resistance / T.T. The [et al.] // Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.; ed. T.E. Miller, R.M.D. Koebner. – Cambridge, UK. – 1988. – P. 901–906.
44. Mapping of two linked TTKSK stem rust resistance genes on chromosome arm 2BL in hexaploid wheat / M.N. Rouse [et al.] // Borlaug Global Rust Initiative, Technical Workshop. Poster Abstracts. St. Petersburg 1–4 June 2010. – St. Peterburg, Russia. – 2010. – P. 38.
45. Identification of markers linked to the race Ug99 effective stem rust resistance gene *Sr28* in wheat (*Triticum aestivum* L.) / M.N. Rouse [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – Vol. 125. – P. 877–885.
46. Breeding for Rust Resistance in Winter Wheat in Szeged, Hungary / M. Csosz [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 255.
47. Identification of *Sr31* and *Sr36* stem rust resistance genes in wheat cultivars registered in Hungary / L. Purnhauser [et al.] // Cereal Research Communications. – 2011. – Vol. 39, № 1. – P. 53–66.
48. Population structure of wheat disease pathogens causing epiphytotics in Southern Russia / G. Volkova // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 230.
49. Волкова, Г.В. Стеблевая ржавчина пшеницы / Г.В. Волкова, Е.В. Синяк // Научный журнал КубГАУ. – 2011. – № 72 (08). – С. 14–16.
50. Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко / Л.А. Беспалова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 37–43.
51. Jin, Y. Resistance in US wheat to recent eastern African isolates of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* with virulence to resistance gene *Sr31* / Y. Jin, R.P. Singh // Plant Disease. – 2006. – Vol. 90. – P. 476–480.
52. Genotyping of U.S. Wheat Germplasm for Presence of Stem Rust Resistance Genes *Sr24*, *Sr36* and *SrIRS^{Amigo}* / E.L. Olson. [et al.] // Crop Sci. – 2010. – Vol. 50. – P. 668–675.
53. Sebesta, E.E. Transfer of greenbug resistance from rye to wheat with X-rays / E.E. Sebesta, E.A. Wood, Jr. // Agronomy Abstracts. – 1978. – Vol. 70, N 61. – P. 61–61.
54. Ukrainian and Russian common wheat varieties carrying the stem rust resistance gene *SrIRS^{Amigo}* conferring resistance to Ug99 / A.A. Sozinov [et al.] // Borlaug Global Rust Initiative, Technical Workshop. Poster Abstracts. St. Petersburg 1–4 June 2010. – St. Peterburg, 2010. – P. 39.
55. Генетическая детерминация устойчивости пшеницы к *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, происходящая от *Aegilops cylindrica*, *Triticum erebuni* и Амфидиплоида 4 / О.В. Бабаянц [и др.] // Цитология и генетика. – 2012. – № 1. – С. 10–17.
56. Resistance genes for rye stem rust (*SrR*) and barley powdery mildew (*Mla*) are located in syntenic regions on short arm of chromosome / R. Mago [et al.] // Genome. – 2004. – Vol. 47. – P. 112–121.
57. Cytogenetic manipulation to enhance the utility of alien resistance genes / M.O. Pumphrey [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 93–100.
58. Developing and optimizing markers for stem rust resistance in wheat / L.-X. Yu [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 117–130.
59. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production / R.P. Singh [et al.] // Annu. Rev. Phytopathol. – 2011. – Vol. 49. – P. 465–481.
60. Resistance to wheat stem rust in Triticale (\times *Triticosecale*) / P.D. Olivera [et al.] // Proc. of Oral Papers and Posters, Technical Workshop, BGRI, Cd. Obregon, Sonora, Mexico. – 2009. – P. 240.
61. Shiferaw, G.A. Recent advances and future perspectives in resistance breeding against *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, strain Ug99 / G.A. Shiferaw, B. Hoffmann // Acta Agronomica Hungarica. – 2012. – Vol. 60, № 1. – P. 71–86.

62. Enhancement of wheat stem rust resistant germplasm in Kenya / P.N. Njau [et al.] // *Borlaug Global Rust Initiative, Technical Workshop. Poster Abstracts*. St. Peterburg 1–4 June 2010. – St. Peterburg, 2010a. – P. 29.

63. Release Stem Rust resistant varieties for commercial production in Kenya / P.N. Njau [et

al.] // 8th Int. Wheat Conference: Abstracts of oral and poster presentations, St. Peterburg 1–4 June 2010. – St. Peterburg, 2010 b. – P. 298.

64. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene / M. Frisch [et al.] // *Crop. Science*. – 1999. – Vol. 39. – P. 1895–1898.

Дата поступления статьи 27 мая 2013 г.

Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич, А.Ю. Носова

СОЗДАНИЕ И ОЦЕНКА ВТОРИЧНОГО ГЕНОФОНДА ТРИТИКАЛЕ (*x TRITICOSECALE WITTM.*) ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЕКЦИИ НА КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ПРЕДУБОРОЧНОМУ ПРОРАСТАНИЮ

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

Введение

Наблюдаемый в последнее время в республике динамичный рост посевов тритикале обусловлен такими преимуществами культуры, как высокая урожайность и кормовая ценность зерна, устойчивость к ряду болезней и неблагоприятным почвенно-климатическим условиям. То обстоятельство, что в Беларуси преобладают почвы с невысоким уровнем плодородия, на которых получать хорошие и стабильные урожаи пшеницы удастся далеко не всегда, в немалой степени способствовало внедрению и быстрому росту популярности тритикале. В настоящее время по занятым под этой культурой посевным площадям (около 500 тыс. га) республика занимает второе место в мире. В Госреестр РБ включено более 20 сортов как зарубежной, так и отечественной селекции.

В то же время тритикале свойственен ряд недостатков, которые в значительной мере снижают коммерческий интерес к этой культуре. К наиболее существенным из них относятся склонность к прорастанию на корню и отно-

сительно высокая соломина, обуславливающая предрасположенность к полеганию в условиях интенсивного земледелия.

Возможности традиционной селекции тритикале по этим признакам существенно ограничивает тот факт, что ряд значимых для их проявления генов локализован в хромосомах D-генома пшеницы, отсутствующего у обычных гексаплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов [1, 2]. Наиболее реальный выход из сложившейся ситуации видится в использовании хромосомно-инженерных технологий и создании с их помощью вторичных рекомбинантных форм тритикале, пшеничный компонент кариотипа которых составлен различными сочетаниями хромосом всех трех субгеномов пшеницы (A, B и D).

В статье изложены результаты создания вторичных рекомбинантных форм тритикале и их изучения на перспективность использования в селекции на короткостебельность и устойчивость к предуборочному прорастанию.

Материалы и методы

Для получения вторичных рекомбинантных форм тритикале были использованы современные сорта тритикале Лана, Карго, Мешко ($2n=6x=42$; AABBRR), отобранные по комплексу хозяйственно-полезных признаков, и D(A)- и D(B)-замещенные формы гексаплоидных тритикале, синтезированные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси в 90-х годах прошлого столетия на основе популярных в то время образцов октоплоидных тритикале [3]:

ПРАГЗ-2 с 1D(1A), 2D(2B)-замещениями;

ПРАГЗ-3 с 1D(1A), 6D(6B) – замещениями;

ПРАГЗ-4 с 1D(1A), 2D(2B), 6D(6B)-замещениями.

Анализ геномной структуры экспериментального материала проводился с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг) [4]. Идентификация индивидуальных хромосом A-, B-, D- и R-геномов осуществлялась согласно обобщенной видовой идиограмме дифференциально окрашенных хромосом [5].

Для анализа устойчивости гибридов к предуборочному прорастанию использован метод проращивания свежееубранного зерна в чашках Петри в термостате при температуре 26 °C [6].

Выделение и очистку ДНК осуществляли с

помощью готовых наборов реактивов Genomic DNA Purification Kit K0512 (Fermentas, Литва). Для выявления аллельного состава генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht8* использовались праймеры в модификации Zhang X. et al. (2006) [7].

Продукты ПЦР фракционировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле в 1×TAE буфере в течение

45 мин при напряжении в 100 В. Результат документировался в системе геле документации QUANTUM ST4-1100. Для точного определения размера амплифицированных фрагментов с SSR-маркерами был проведен фрагментный анализ продуктов ПЦР. Данные анализировались в программной среде, поставляемой с прибором AppliedBiosystems 3500 Genetic Analyzer.

Результаты и обсуждение

Получение линейного материала вторичных рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале

С целью создания вторичных хромосомно-замещенных форм гексаплоидных тритикале замещенные линии гексаплоидных тритикале ПРАГЗ-2, ПРАГЗ-3 и ПРАГЗ-4 были скрещены с сортами тритикале Лана, Карго, Мешко (рис. 1).

Полученные гибриды F_1 и F_2 выращивались в условиях принудительного самоопыления. Для создания линейного материала сбор урожая в F_3 был произведен индивидуально по каждому растению. Часть собранных с растения зерен была использована для идентификации хромосомного состава с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг).

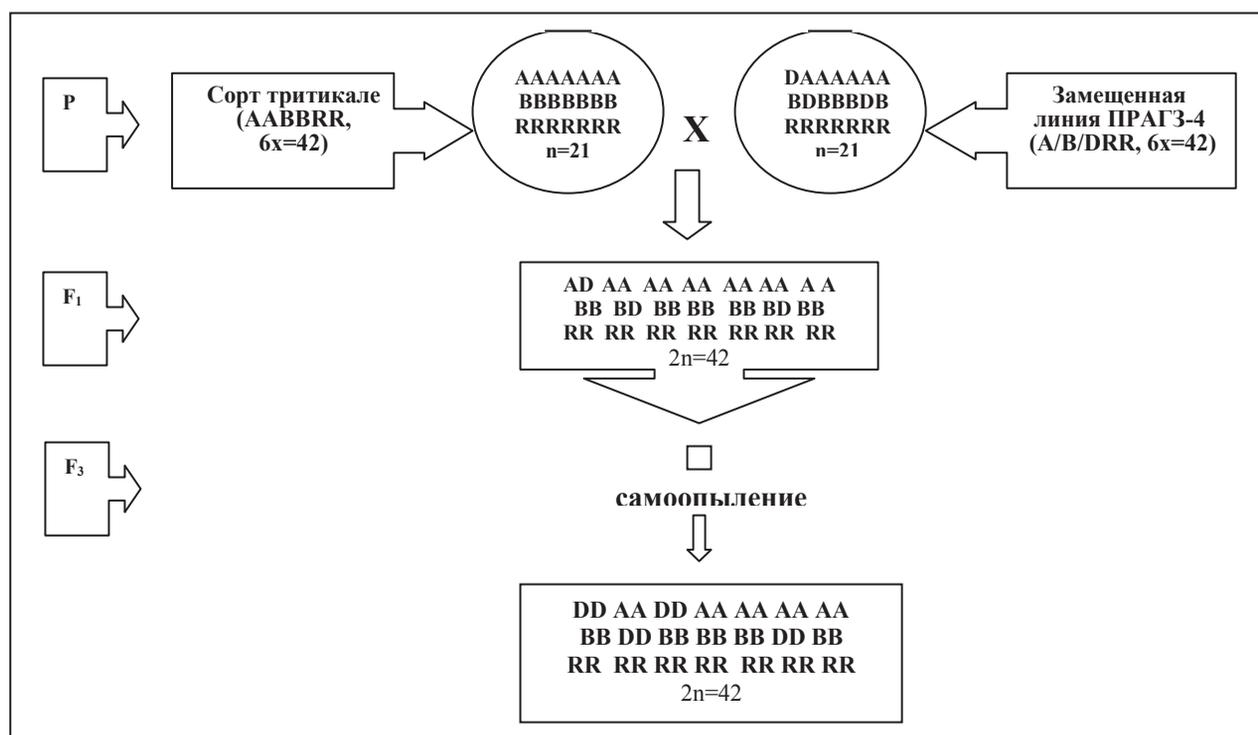


Рис. 1. Схема интрогрессии хромосом D-генома пшеницы в сорта тритикале
Теоретически ожидаемые типы межгеномных замещений: 1D(1A), 2D(2B), 6D(6B)

Анализ геномной структуры гибридных форм показал, что хромосомы D-генома пшеницы включаются в кариотип сортов тритикале с высокой частотой (табл. 1). В общей сложности по всем комбинациям скрещиваний было проанализировано 96 индивидуаль-

ных растений, из которых 73 (76%) содержали хромосомы D-генома пшеницы в моносомном и дисомном состоянии (рис. 2а), при этом процесс интрогрессии D-хромосом зависел от генотипической среды вновь синтезированного гибридного растения.

Таблица 1

Типы межгеномных замещений хромосом в гибридном материале F₄

Комбинация скрещивания	Количество проанализированных индивидуальных растений F ₃ , шт.	Количество растений с интрогрессией хромосом D генома, %	Количество пар хромосом D-генома	Типы замещений
Мешко × ПРАГЗ-4	15	93,3	1 - 3	1D(1A), 2D(2A), 2D(2B), 6D(6B), 6D(6A)
Лана × ПРАГЗ-4	17	41,2	1	1D(1A), 1D(1B), 2D(2B)
Мешко × ПРАГЗ-3	18	67,0	1	1D(1A), 6D(6B)
Карго × ПРАГЗ-3	17	71,4	1 - 2	1D(1A), 6D(6A)
Лана × ПРАГЗ-3	10	100,0	1 - 2	1D(1A), 6D(6B)
Лана × ПРАГЗ-2	19	79,0	1 - 2	1D(1A), 2D(2B), 2D(2A)

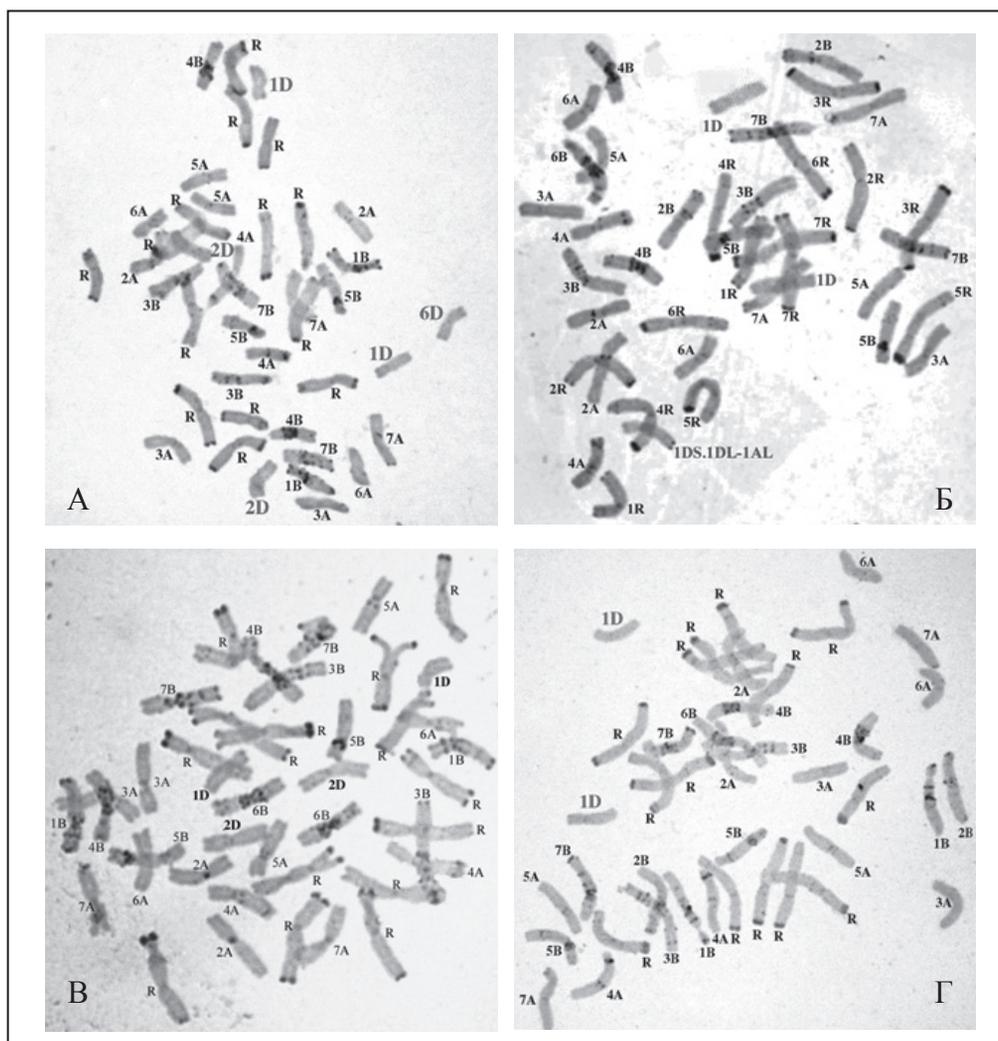


Рис. 2. Кариотипы растений: а) форма из комбинации скрещивания Мешко × ПРАГЗ-4 с 1D(1A)-, 2D(2B)-, моно-6D(6B)-замещениями; б) форма из комбинации скрещивания Лана × ПРАГЗ-4 с 1D(1B)-замещением хромосом и aberrантной 1DS.1DL-1AL-хромосомой; в) линии № 12 с 1D(1A)- и 2D(2B)-замещениями хромосом; г) линии № 7 с 1D(1A)- замещением хромосом

Самая низкая частота интрогрессии хромосом D-генома (41,2%) отмечена в комбинации скрещивания Лана × ПРАГЗ-4, тогда как в комбинации Лана × ПРАГЗ-3 этот показатель был равен 100%, из чего следует, что, расширяя генетическое разнообразие включенных в гибридизацию сортов и хромосомно-замещенных линий, можно существенно повысить частоту образования рекомбинантных A/B/DRR форм.

Если оценивать в целом частоту интрогрессии индивидуальных хромосом D-генома в кариотип 6х-тритикале, то более низкой частотой характеризовалась хромосома 6D (36,1%). Хромосома 2D в проанализированном материале встречалась с частотой 49%, причем у 88% индивидуальных растений присутствовала в дисомном состоянии. Самая

высокая частота интрогрессии была отмечена для хромосомы 1D – ее содержали 65,6% растений F₄, в том числе в дисомном состоянии – 73%.

В потомстве F₄ были отмечены случаи образования aberrантных хромосом: 1DS.1DL-1AL (рис. 2б) у двух растений (Лана × ПРАГЗ-4) и 3DS-3AS.3AL у растения в комбинации Лана × ПРАГЗ-3.

По результатам геномного анализа из гибридных популяций F₄ было выделено 8 стабильных рекомбинантных линий с различными типами D(A)- и D(B)-замещений хромосом в дисомном состоянии (табл. 2, рис. 2 в, г), которые были оценены на перспективность использования в селекции на короткостебельность и устойчивость к предуборочному прорастанию.

Таблица 2

Типы межгеномных замещений хромосом у вторичных рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале

Комбинация скрещивания	Номер линии	Типы межгеномных замещений хромосом
Лана × ПРАГЗ-2	6	2D(2B)
	12	1D(1A), 2D(2B)
Лана × ПРАГЗ-3	4	6D(6B)
	11	1D(1A), 6D(6B)
Карго × ПРАГЗ-3	14	1D(1A)
	22	1D(1A)
Мешко × ПРАГЗ-3	3	1D(1A)
	7	1D(1A)

Морфометрический анализ рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале

Для предварительной оценки и отбора наиболее перспективных для дальнейшей селекционной проработки образцов был проведен морфометрический анализ вторичных рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале. Поскольку традиционная селекция тритикале на устойчивость к полеганию и предуборочному прорастанию зерна базируется на анализе ряда морфологических признаков, оказывающих влияние на степень проявления этой устойчивости, в ходе исследования, кроме признаков продуктивности, оценивались также высота растения, плотность колоса и остистость. Результаты оценки представлены в табл. 3.

Высота растения является основным лимитирующим фактором устойчивости к поле-

ганию. Как видно из табл. 3, значение этого признака у проанализированных линий колеблется от 105,2 до 123,37 см. Согласно существующей классификации ВИР, все проанализированные линии (за исключением линии № 3) относятся к категории среднерослых.

По совокупности признаков продуктивности выделяется линия № 22. Близка к ней по значениям массы зерна с колоса и массы 1000 зерен линия № 12, которая также характеризуется более высокой плотностью колоса, что делает ее более устойчивой к предуборочному прорастанию, поскольку, чем плотнее скомпонован колос, тем меньше вероятность попадания в него влаги при выпадении осадков [6]. Наиболее высокая плотность колоса (26,4 колоска на 10 см длины колоса) отмечена для линии № 6, наименьшая (22,5 колосков на 10 см длины колоса) – линии № 4 (рис. 3).

Таблица 3

**Морфометрический анализ вторичных хромосомно-замещенных форм
гексаплоидных тритикале**

Линия, №	Высота растения, см	Длина колоса, см	Количество колосков в колосе, шт.	Плотность колоса
6	105,27±1,00	8,28±0,16	21,80±0,33	26,42±0,35
12	118,33±1,22	8,88±0,19	21,73±0,38	24,73±0,40
4	113,50±1,37	10,20±0,19	22,83±0,34	22,50±0,26
11	105,20±1,73	8,25±0,20	19,07±0,40	23,23±0,34
14	113,30±1,66	8,90±0,18	22,13±0,31	25,02±0,34
22	113,77±1,10	8,95±0,18	20,13±0,35	22,59±0,32
3	123,37±1,49	8,50±0,20	22,00±0,45	26,02±0,34
7	111,13±1,93	8,70±0,09	21,73±0,22	25,02±0,25

Продолжение табл. 3

Линия, №	Количество цветков в колосе, шт.	Количество зерен в колосе, шт.	Завязываемость	Масса зерна с колоса, г	Масса 1000 зерен, г
6	58,40±1,69	36,83±1,74	62,61±1,88	1,36±0,08	37,00±1,17
12	58,13±1,71	34,30±1,72	58,67±2,31	1,41±0,08	40,97±1,22
4	66,07±2,04	32,80±1,18	49,78±1,09	1,01±0,04	30,71±0,59
11	48,50±1,54	27,83±1,71	57,07±2,77	1,05±0,07	37,54±1,12
14	66,37±2,08	36,03±2,05	53,95±2,27	0,77±0,05	21,64±1,16
22	57,77±1,57	35,40±1,26	61,11±1,21	1,47±0,07	41,51±1,28
3	58,27±1,57	34,10±1,42	58,62±1,89	1,17±0,06	34,64±1,27
7	61,93±1,27	38,07±1,86	61,12±2,54	1,10±0,07	28,96±1,07

На прорастание зерна в колосе, кроме плотности колоса, влияют такие морфологические особенности как наличие остей и степень открытия цветковых чешуй. Согласно литературным данным сорта, которые характеризуются сочетанием остистости, рыхлого колоса и открытых цветковых чешуй, имеют тенденцию к прорастанию на корню [6]. В плане остистости среди проанализированных вторичных рекомбинантных форм выделяется линия № 7 – растения этой линии имеют полуостистые колосья с короткими остями. Линии № 3, № 4 и № 11 также характеризуются наличием полуостистых колосьев, но с остями средней длины (рис. 3а). Для остальных линий отмечено наличие длинных остей, расположенных по всему колосу.

Таким образом, по совокупности морфологических и количественных признаков в проана-

лизированном материале для дальнейшей селекционной работы можно выделить линию № 12 из комбинации скрещивания Лана × ПРАГЗ-2.

Лабораторная оценка на устойчивость к предуборочному прорастанию рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале

Для лабораторной оценки устойчивости гибридных форм к предуборочному прорастанию был использован метод проращивания свежубранного зерна в чашках Петри. В ходе исследования анализировалось число проросших зерен (ППЗ) при проращивании в чашках Петри (по 100 зерен каждого образца в двух повторностях) в течение 24 и 48 ч. При этом число проросших зерен через 24 ч показывает стартовую способность прорастания самого зерна, а через 48 ч определяются межсортные различия по прорастанию зерна тритикале.

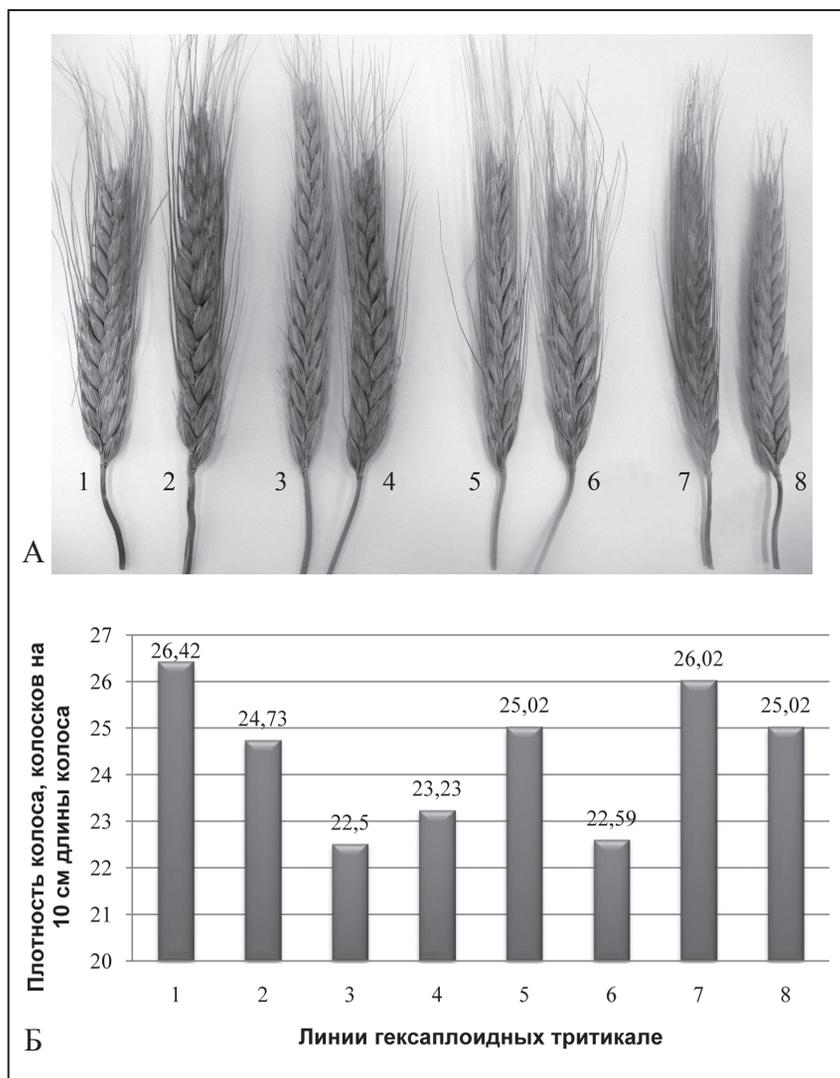


Рис. 3. а) колосья рекомбинантных линий гексаплоидных тритикале; б) показатель плотности колоса у рекомбинантных линий гексаплоидных тритикале

1 – линия № 6; 2 – линия № 12; 3 – линия № 4; 4 – линия № 11; 5 – линия № 14; 6 – линия № 22; 7 – линия № 3; 8 – линия № 7

Как видно из табл. 4, среди рекомбинантных линий, полученных с участием сорта Мешко, одна по среднему значению показателя ППЗ была на уровне исходного сорта, а другая незначительно превосходила его. Среди двух линий на основе сорта Карго линия № 14 характеризовалась пониженной устойчивостью к предуборочному прорастанию зерна, в то время как у линии № 22 значение ППЗ было на 16% ниже, чем у исходного сорта (обе линии содержат 1D(1A)-замещение хромосом). В материале, полученном с участием сорта Лана, две рекомбинантные линии с одиночными межгеномными замещениями хромосом (линия № 6 с 2D(2B)-замещением и линия

№ 4 с 6D(6B)-замещением хромосом) имели значение ППЗ на 2–4% выше, чем у сорта, в то время как линия № 12 с 1D(1A)- и 2D(2B)-замещениями и линия № 11 с 1D(1A)- и 6D(6B)-замещениями были более устойчивы к прорастанию на корню.

Особого внимания при этом заслуживает линия № 11, у которой среднее по двум повторностям опыта значение ППЗ было почти в два раза ниже (на 44,6%), чем у сорта Лана. Данная линия может быть рекомендована для включения в селекционный процесс в качестве исходного материала при создании устойчивых к предуборочному прорастанию сортов тритикале.

Таблица 4

**Оценка устойчивости рекомбинантных форм тритикале
к предуборочному прорастанию зерна**

Комбинация скрещивания, номер линии	Количество проросших зерен (1-я повторность), %		Количество проросших зерен (2-я повторность), %	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
Карго × ПРАГЗ-3 Линия № 14	74,75	85,86	75,76	85,86
Карго × ПРАГЗ-3 Линия № 22	49,45	67,73	28,57	50,08
Лана × ПРАГЗ-2 Линия № 6	77,55	82,65	72,73	83,73
Лана × ПРАГЗ-2 Линия № 12	45,45	70,71	53,19	65,96
Лана × ПРАГЗ-3 Линия № 4	80,61	88,69	64,00	74,00
Лана × ПРАГЗ-3 Линия № 11	18,48	31,81	23,71	36,84
Мешко × ПРАГЗ-3 Линия № 3	60,61	74,61	64,00	74,00
Мешко × ПРАГЗ-3 Линия № 7	65,66	81,82	65,00	79,00
Карго	57,00	72,00	67,00	78,00
Лана	80,81	84,85	69,00	73,00
Мешко	64,89	70,89	69,00	81,00

Анализ аллельного состава генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht8* у рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале

Проведенный нами предварительный анализ геномной структуры вторичных линий тритикале с помощью дифференциального окрашивания хромосом по Гимза дает возможность целенаправленно использовать ПЦР-маркеры для идентификации аллелей генов короткостебельности.

Как известно, ген *Rht-B1* локализован в коротком плече хромосомы 4В и, следовательно, будет присутствовать у всех отобранных рекомбинантных линий. Интерес для селекции на короткостебельность представляет мутантный аллель этого гена *Rht-B1b*, гомозиготность по которому по имеющимся данным обеспечивает снижение высоты растений пшеницы на 41–42%.

Анализ рабочей коллекции по аллельному составу гена *Rht-B1* показал (табл. 5), что му-

тантный аллель *Rht-B1b* содержат все рекомбинантные линии за исключением № 3 и № 7 (рис. 4). Линия № 3 характеризуется наличием дикого аллеля гена *Rht-B1* (*Rht-B1a*) (рис. 4), а у линии № 7 ген *Rht-B1* представлен как диким, так и мутантным аллелем.

Ген *Rht8* локализован в коротком плече хромосомы 2D. Согласно данным кариотипирования, хромосома 2D присутствует в геноме двух отобранных вторичных рекомбинантных линий – № 6 и № 12 (табл. 2). При использовании молекулярного маркера *Xgwm261* к гену *Rht8* амплифицируются фрагменты размером 165, 174, 180, 192, 200, 204 п.н., однако только фрагмент 192 п.н. специфичен для коммерческого аллеля данного гена *Rht8c*. В ходе фрагментного анализа полученных продуктов ПЦР было установлено, что у исследованных замещенных форм гексаплоидных тритикале присутствует аллель дикого типа *Rht8a* (165 п.н.).

Таблица 5

Аллельный состав гена короткостебельности *Rht-B1* у рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале

Комбинация скрещивания, линия	Аллели гена <i>Rht-B1</i>
Мешко × ПРАГЗ-3, линия № 3	<i>Rht-B1a</i>
Лана × ПРАГЗ-3, линия № 4	<i>Rht-B1b</i>
Лана × ПРАГЗ-2, линия № 6	<i>Rht-B1b</i>
Мешко × ПРАГЗ-3, линия № 7	<i>Rht-B1b, Rht-B1a</i>
Лана × ПРАГЗ-3, линия № 11	<i>Rht-B1b</i>
Лана × ПРАГЗ-2, линия № 12	<i>Rht-B1b</i>
Карго × ПРАГЗ-3, линия № 14	<i>Rht-B1b</i>
Карго × ПРАГЗ-3, линия № 22	<i>Rht-B1b</i>

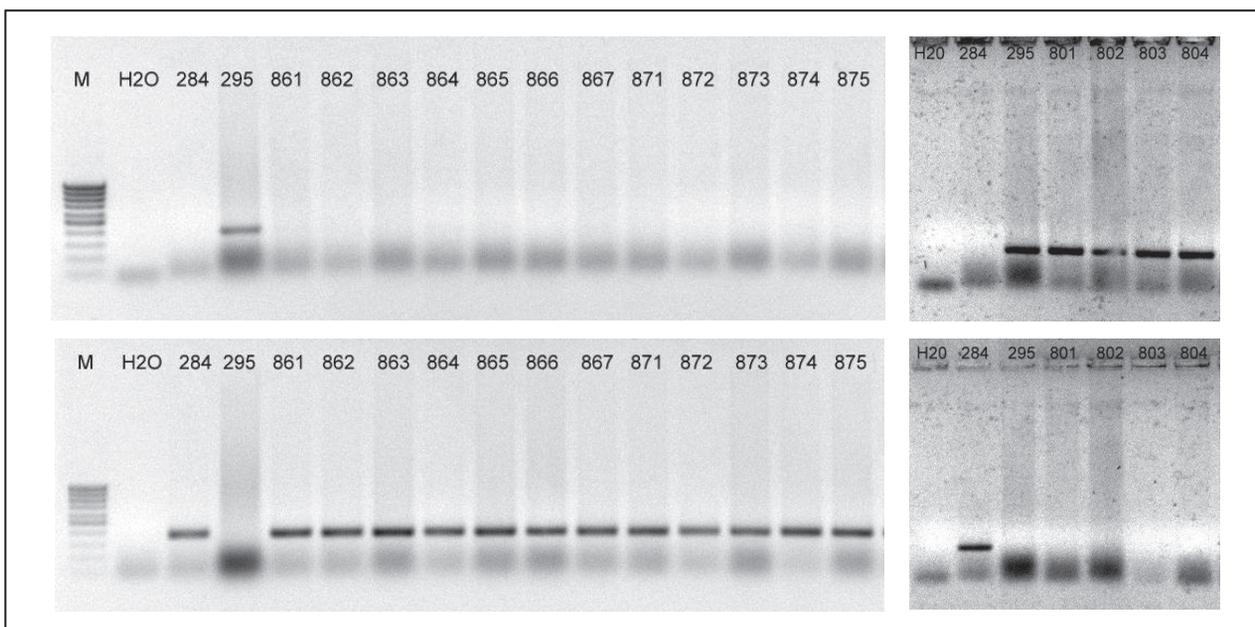


Рис. 4. Электрофореграмма детекции аллелей *Rht-B1a* (верхняя) и *Rht-B1b* (нижняя) у рекомбинантных линий тритикале № 14, № 22 и № 3.

M – маркер молекулярного веса Праймтех™, M100 bp, 284 – DEO6232/01 (положительный контроль на *Rht-B1b*), 295 – ПРАГЗ-5 – положительный контроль на *Rht-B1a*, с 861 по 867 – образцы линии № 14; с 871 по 875 – образцы линии № 22; с 801 по 804 – образцы линии № 3

Заключение

Представленные выше результаты исследований свидетельствуют об эффективности применения хромосомно-инженерных технологий для расширения генетического разнообразия гексаплоидных тритикале. В ходе экспериментов показана высокая частота включения хромосом D-генома в кариотип сортов тритикале и довольно быстрая стабилизация хромосомного состава гибридного материала. Выявлена зависимость результативности процесса интрогрессии хромосом

D-генома пшеницы в кариотип гексаплоидных тритикале от генотипической среды создаваемой гибридной формы, из чего следует что, расширяя генетическое разнообразие включенных в гибридизацию сортов тритикале, можно существенно повысить частоту образования рекомбинантных A/B/DRR форм. По совокупности проведенного анализа выделены рекомбинантные линии гексаплоидных тритикале № 11 и № 12, которые могут быть рекомендованы для включения в селекцион-

ный процесс в качестве исходного материала при создании сортов тритикале, устойчивых к полеганию и предуборочному прорастанию.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договор № Б12-042).

Список использованной литературы

1. Lafferty, J. Substitution of chromosome 1D into hexaploid triticales to improve bread-making quality / J. Lafferty, T. Lelley // Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement. – Wien: WUV-Univ.-Verl. – 1998. – P. 376–380.
2. Идентификация генов короткостебельности *Rht2* и *Rht8* у образцов гексаплоидного тритикалес помощью ДНК маркеров / К.У. Куркиев [и др.] // Информационный вестник ВОГиС. – 2008. – Т. 12, №3. – С. 372–376.
3. Реконструкция кариотипа гексаплоидных тритикале путем межгеномных замещений хромосом / Н.И. Дубовец [и др.] // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 10. – С. 1394–1399.
4. Бадаева, Е.Д. Изменение хромосом ржи в кариотипе тритикале: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Е.Д. Бадаева. – М., 1984. – 181 л.
5. “Chromosomal passport” of *Triticum aestivum* L. em Thell. cv. Chinese Spring and standardization of chromosomal analysis of cereals / E.D. Badaeva [et al.] // Cereal Res. Commun. – 1990. – Vol. 18, № 4. – P. 273–281.
6. Нгуен, Т.Т.Л. Разработка системы оценок устойчивости к прорастанию на корню озимой тритикале: автореферат дис. ... канд. с-х наук: 06.01.05 / Т.Т.Л. Нгуен. – М., 2011. – 22 с.
7. Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1* and *Rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers / X. Zhang [et al.] // Euphytica. – 2006. – Vol. 152, № 1. – P. 109–116.

Дата поступления статьи 29 августа 2013 г.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ РАСТЕНИЙ *CALLUNA VULGARIS* И *ARCTOSTAPHYLOS UVA-URSI* (СЕМЕЙСТВА *ERICACEAE*), ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ДЕКОРАТИВНЫХ ПОСАДОК

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
²ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

Введение

Зеленые насаждения являются обязательным компонентом архитектуры современных городов. Решая эстетические и экологические проблемы, декоративные растения формируют микроклимат города, создают комфортную и гармоничную среду. Ассортимент растений, применяемых для озеленения населенных мест, должен быть широким и интересным, с учетом возможности использования его для различных целей: создания клумб, рокариев, фигурных насаждений, одиночных или групповых посадок и других объектов. В связи с этим, в сфере зеленого строительства все большую популярность приобретают кустарниковые растения многофункционального назначения, перспективные для озеленения населенных пунктов Беларуси. Представители семейства вересковые (*Ericaceae*) широко используются в ландшафтном дизайне благодаря своей неприхотливости, широкому разнообразию видов, форм, размеров.

Вереск обыкновенный (*Calluna vulgaris* (L) Hull.) – популярное декоративное растение, способное украсить любой архитектурный и ландшафтный объект. Вереск обладает своеобразным, так называемым эрикоидным обликом, который создают деревянистые побеги, покрытые мелкими кожистыми листьями. Толокнянка обыкновенная (*Arctostaphylos uva-ursi* (L) Spreng.), помимо традиционных лекарственных свойств, нашла применение в садовом дизайне как декоративный кустарник. Благодаря стелющимся побегам с вечнозелеными листьями, толокнянка используется как почвопокровное растение для разных типов озеленительных посадок.

Оба вида являются представителями семейства *Ericaceae* и приспособлены к климатическим условиям Беларуси. Расширение

ассортимента декоративных растений за счет генофонда аборигенных видов и полученных на их основе новых форм является в настоящее время актуальной задачей. Использование растений из местной флоры помогает избежать ряд проблем, главные из которых – адаптация к новым условиям среды и разработка специфических технологий выращивания. Получение новых форм методом индивидуального отбора из природных популяций и выращивание их за пределами природных ареалов служит эффективным способом повышения разнообразия генофонда растений и позволяет создавать генотипы с ценными декоративными признаками. Возможность отбора обусловлена полиморфизмом природных популяций, который определяется генетической изменчивостью и носит наследуемый характер [1].

Использование молекулярных маркеров позволяет целенаправленно подобрать генотипы для последующей селекционной работы, а также выявить генетическое различие исходных и новых форм декоративных растений, что значительно сокращает сроки селекции. В настоящее время представлены немногочисленные данные по ДНК-анализу вереска обыкновенного и толокнянки обыкновенной. Молекулярно-генетическое исследование представителей семейства *Ericaceae* направлено главным образом на оценку гетерогенности образцов, а также для уточнения таксономии и филогении видов [2]. Borchert et al. с помощью RAPD- и ISSR-анализа выявили невысокое генетическое разнообразие 74 сортов *C. vulgaris*. По результатам исследования была разработана система идентификации новых сортов, полученных из вереска обыкновенного или других вегетативно размножаемых культур [3]. Для исследова-

ния хозяйственно-ценных признаков вереска используются методы маркер-сопутствующей селекции. Несколько типов молекулярных маркеров были использованы для маркирования т.н. «бутоначатых» цветов вереска, бутоны которых не раскрываются и в течение всего вегетационного сезона имеют свежий и яркий цвет, что значительно повышает экономическую ценность этой формы вереска. [4–5]. Новая классификация семейства *Ericaceae* составлена на основе анализа последовательности ядерной и хлоропластной ДНК, а также морфологии, анатомии и эмбриологии [6–7]. Филогенетические взаимоотношения различных представителей вересковых исследованы при помощи анализа пластидных и митохондриальных генов. При

помощи шести молекулярных маркеров выяснены взаимоотношения 19 родов подсемейства *Ericoideae*. Полученные результаты нашли применение для уточнения филогенетических связей близких таксонов [8–9].

Цель нашего исследования состояла в идентификации новых форм вереска обыкновенного и толокнянки обыкновенной, полученных из природных популяций методом индивидуального отбора по декоративным признакам. Различия на уровне ДНК позволят выяснить, носит ли изменчивость декоративных признаков адаптивный характер при неизменности генотипа или полученные формы генетически отличаются от исходных образцов и могут стать основой новых сортов.

Материалы и методы

Исследованы три формы вереска – исходный аборигенный вид и две новые формы: одна с лилово-розовыми и вторая с белыми цветами, полученные из аборигенного вида. Объектами исследования также являлись новая форма толокнянки, перспективная для использования в озеленении, и исходная дикорастущая форма толокнянки обыкновенной.

Генетическую гетерогенность представителей семейства *Ericaceae* оценивали при помощи ISSR-анализа и RAPD-анализа. Для RAPD-анализа использовали 8 праймеров: ISSR-4, ISSR-8, ISSR-9a, ISSR-10, ISSR-17, ISSR-22, ISSR-23, ISSR-24. Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала: 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ $MgCl_2$, 10 пМ праймера, 0,1 ед. Taq-полимеразы в 1х буфере, 25 нг ДНК. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе Bio-Rad в следующем температурном режиме: первая денатурация – 94 °С 4 мин; 35 циклов – 94 °С 50 с, 49–54 °С 50 с, 72 °С 1 мин 10 с; заключительная элонгация – 72 °С 7 мин. Продукты амплификации разделяли в 1,7%-ном агарозном геле и документировали в системе GelDoc (BioRad). Для каждого праймера поставлена ПЦР в градиенте температур от 47,7 до 55,8 °С и подобрана соответствующая температура элонгации ПЦР-

реакции, позволяющая получать максимально возможное для данного праймера количество полиморфных фракций.

Для RAPD-анализа использовали 10 праймеров: OPW 15, OPW 19, OPA F16, OPA C20, OPA C10, OPA H14, OPA H13, OPC 08, OPC 05, OPD 07. Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала: 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ $MgCl_2$, 10 пМ праймера, 0,1 ед. Taq-полимеразы в 1х буфере, 20 нг ДНК. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе Bio-Rad при следующем температурном режиме: первая денатурация – 94 °С 4 мин; 35 циклов – 94 °С 1 мин, 35 °С 1 мин, 72 °С 2 мин; заключительная элонгация – 72 °С 5 мин. Продукты амплификации разделяли в 1,5%-ном агарозном геле и документировали в системе GelDoc (BioRad).

Полиморфизм оценивали по наличию-отсутствию фрагментов, интенсивность фракций как полиморфный признак не учитывали. Уровень полиморфизма праймера оценивали как отношение числа полиморфных фрагментов к общему числу амплифицированных фрагментов. Генетический полиморфизм генотипа определяли как отношение числа полиморфных локусов к общему числу детектируемых локусов.

Результаты и обсуждение

В результате исследования выявлены генетические различия между исходными и новыми формами вереска и толокнянки.

Количество полиморфных ISSR-фрагментов,

детектированное у видов толокнянки, составило 53. Наибольший уровень полиморфизма зафиксирован у праймеров ISSR-17, ISSR-9, ISSR-4 (табл. 1). Размер продуктов

амплификации варьировал от 240 до 2000 п.н. Праймеры ISSR-17, ISSR-24, ISSR-4 выявили наибольшее количество полиморфных фрагментов (12, 9 и 8 соответственно). Минимальная информативность проявлена праймером ISSR-9а (3 полиморфные полосы).

С помощью RAPD-маркеров у толокнянки детектировано 17 полиморфных фракций. Зона разделения RAPD-ампликонов нахо-

дилась в пределах 400–1400 п.н. Большая часть полиморфных фрагментов находилась в области 500–1000 п.н. при этом количество полиморфных полос в зависимости от праймера варьировало от 1 до 4. Наиболее информативными оказались праймеры OPW 19, OPC 08. Праймер OPA H14 не выявил различий между исследуемыми образцами (рис. 1).

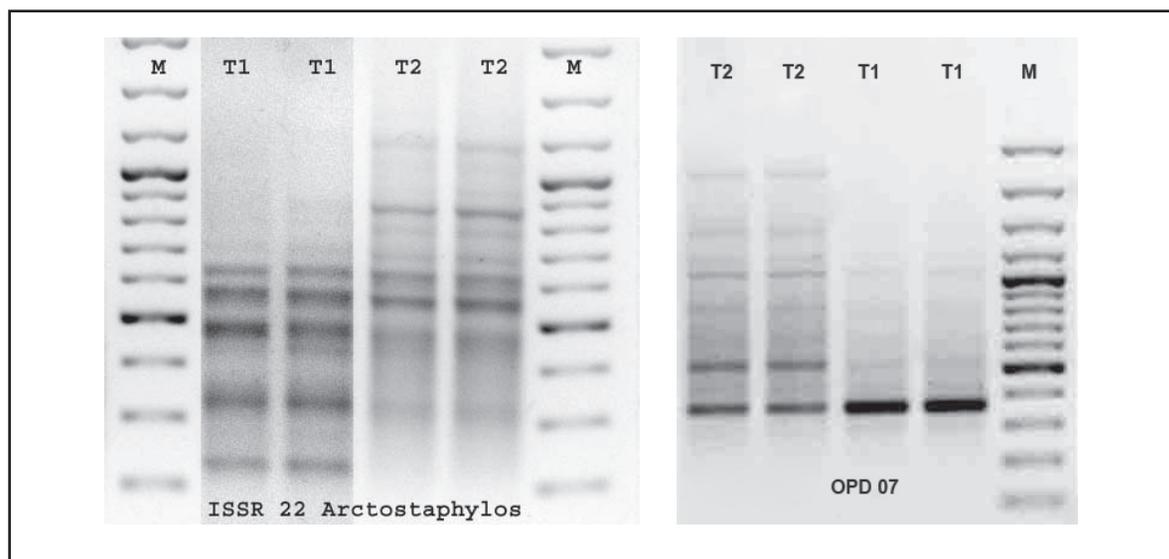


Рис. 1. Результаты амплификации геномной ДНК растений толокнянки обыкновенной с ISSR-22 и OPD 07. T1 – новая форма толокнянки, T2 – аборигенный вид толокнянки

Сравнение результатов амплификации исходной и новой форм толокнянки выявило отличия по варибельности ДНК-фрагментов. Полиморфизм между исследуемыми образцами проявлялся в присутствии полиморфной полосы у одной формы и, соответственно, ее отсутствия у другой. У дикорастущей формы присутствует 62% полиморфных ISSR-фрагментов и 72% полиморфных RAPD-фрагментов. Если рассматривать отсутствие

фрагмента как рецессивное состояние локуса, то полученные результаты указывают на более низкую генетическую варибельность новой формы толокнянки по сравнению с исходной формой. В то же время, наличие у исходной формы большого запаса варибельных локусов свидетельствует о потенциале генетической изменчивости и возможности его использования в дальнейшем для получения новых генотипов.

Таблица 1

Характеристика молекулярных маркеров, использованных для исследования представителей семейства *Ericaceae*

Название праймера	Толокнянка обыкновенная			Вереск обыкновенный		
	Общее число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %	Общее число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %
OPA C10	8	2	25	13	9	69
OPA H14	4	0	0	10	1	70

Продолжение табл. 1

Название праймера	Толокнянка обыкновенная			Вереск обыкновенный		
	Общее число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %	Общее число амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %
OPA F16	9	2	22	7	7	100
OPB 08	9	3	33	7	4	57
OPW 19	11	4	36	13	11	85
OPA C20	8	1	12	10	8	80
OPA H13	6	1	17	10	5	50
OPC 05	10	2	20	9	5	56
OPC 07	7	2	29	10	5	50
ISSR-4	14	8	57	26	22	85
ISSR-9	10	6	60	10	7	70
ISSR-9a	11	3	27	10	1	10
ISSR-10	12	5	42	16	16	100
ISSR-17	13	12	92	18	9	50
ISSR-22	11	5	45	17	6	35
ISSR-23	12	5	42	15	7	47
ISSR-24	16	9	56	16	7	44

Исследование трех форм вереска обыкновенного позволило установить различия между генотипами исходной и новых форм, а также между двумя новыми формами (рис. 2). У вереска выявлено 75 переменных ISSR-ампликонов и 61 полиморфный RAPD-фрагмент. Все используемые в исследовании ISSR-праймеры оказались эффективными в поиске полиморфизма между близкородственными образцами. Наибольшую информативность в изучении вереска обыкновенного проявили праймеры ISSR-10 и ISSR-4 (табл. 1). При помощи ISSR-4 и ISSR-10 зафиксировано наибольшее количество переменных полос (22 и 16 соответственно). Наименее информативен праймер ISSR-9a (1 полиморфная фракция), остальные праймеры позволяли получать 6–9 переменных фрагментов. Общее количество полиморфных ISSR-фрагментов – 75. Размер продуктов амплификации ISSR-анализа варьировал от 260 до 1700 п.н.

Несколько ниже, но тоже достаточно информативными оказались используемые в работе RAPD-праймеры, позволившие получить 61 переменный ампликон. Максимальное

количество полиморфных фракций получено при помощи OPA C10 (9 фракций) и OPW 19 (11 фракций). Остальные праймеры позволяли получать по 4–8 переменных ампликонов. Наибольший уровень полиморфизма зафиксирован у праймеров OPA C20, OPW 19, OPA F16. Размер продуктов амплификации варьировал в пределах 300–3000 п.н.

Полиморфизм между исследуемыми образцами проявлялся в виде наличия полиморфной полосы у одной или двух из исследуемых форм. Из 75 детектированных полиморфных ISSR-фрагментов 48 отмечено в спектрах вереска розовоцветкового. Уникальных фрагментов (встречающихся только у одного из исследуемых образцов) также было больше у вереска розовоцветкового. В спектрах вереска белоцветкового чаще присутствовали полиморфные RAPD-фрагменты (35 из 61 детектированной полосы), однако среди них не было уникальных ампликонов, и в целом спектры этого генотипа напоминали спектры исходной аборигенной формы. Присутствие в геномах новых форм вереска более 25% полиморфных локусов свидетельствует об относительно высоком

потенциале генетической изменчивости и предполагает возможность использования их в качестве селекционного материала.

По результатам ISSR-анализа установлено, что формы вереска розовоцветкового и вереска белоцветкового отличаются от дикорастущей формы вереска на 16% и 15%, соответственно. Генетический полиморфизм между двумя новыми формами составляет 28%. Следовательно, ISSR-анализ позволил в равной степени эффективно выявить различия

между всеми исследуемыми образцами. По результатам RAPD-анализа установлены различия между исходной формой вереска и формой вереска розовоцветкового – 45%. В то же время, в изучении исходной формы вереска и вереска белоцветкового используемые RAPD-праймеры оказались неэффективны, выявив только 1% генетического различия. Дивергенция новых форм вереска между собой по RAPD-ампликонам составила 13%.

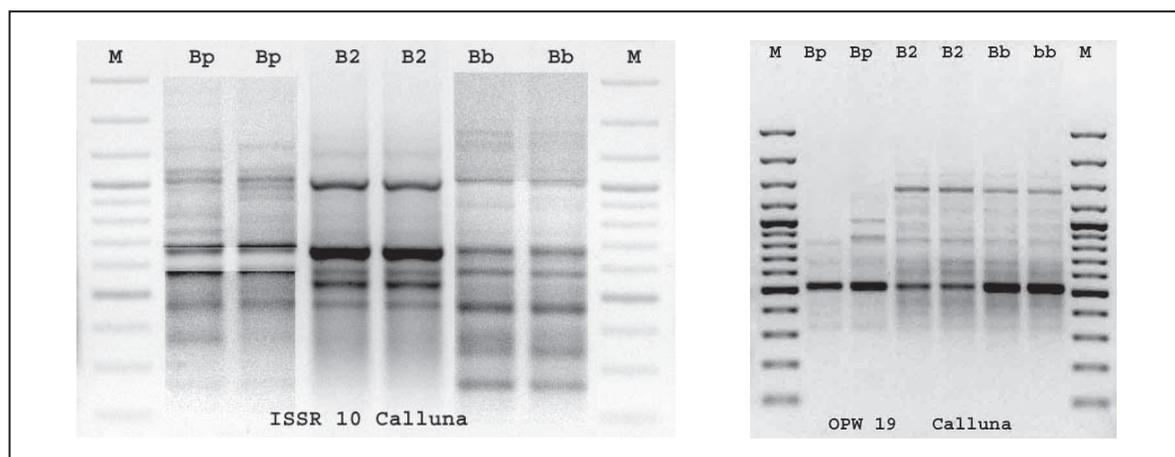


Рис. 2. Результаты амплификации геномной ДНК растений вереска обыкновенного с ISSR-10 и OPW 19. Bp – вереск розовоцветковый, B2 – аборигенный вид вереска, Bb – вереск белоцветковый

Заключение

Таким образом, выявлены генетические отличия новых форм вереска обыкновенного и толокнянки обыкновенной от исходных генотипов. Индивидуальный отбор по декоративным признакам позволил выделить из природных популяций генетически гетерогенные образцы, которые могут стать исходным материалом при создании новых сортов.

Уровень полиморфизма, выявленный по результатам ISSR- и RAPD-анализа, позволил эффективно идентифицировать новые формы. Для исследования молекулярно-генетического разнообразия видов и форм толокнянки

обыкновенной более информативным является ISSR-анализ. Использование набора из трех праймеров (ISSR-4, ISSR-10, ISSR-17) позволяет выявить более 62% полиморфных локусов. Для выявления различий между исходной формой вереска и новой формой вереска розовоцветкового одинаково эффективно использование как ISSR, так и RAPD-анализа. Оба метода оказались информативны и для поиска различий между двумя новыми формами вереска. Для выявления различий между исходной и новой формой вереска белоцветкового предпочтительнее применять ISSR-анализ.

Список использованных источников

1. Баханова, М.В. Интродукция растений: учеб.-метод. пособие / М.В. Баханова, Б.Б. Намзалов. – Улан-Удэ: Изд-во Бурятского государственного университета, 2009. – 207 с.
2. Genetic characterization of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) subject to different management regimes across Great Britain /

A. Meikle [et al.] // *Mol. Ecology*. – 1999. – Vol. 8. – P. 2037–2047.

3. Implementation of a model for identifying Essentially Derived Varieties in vegetatively propagated *Calluna vulgaris* varieties [Электронный ресурс] / T. Borchert [et al.] // *BMC Genetics*. – 2008. – Режим доступа: <http://>

www.biomedcentral.com./content/pdf/1471-2156-9-56.pdf. – Дата доступа: 02.07.2013.

4. Borchert, T., Hohe, A. Molecular markers for the flower phenotype of the ornamental crop *Calluna vulgaris* [Электронный ресурс] / Т. Borchert, А. Hohe // eBioPoster. – 2009. – Режим доступа: http://ebio-poster.com/index.php?option=com_content&view=article&id=249. – Дата доступа: 02.07.2013.
5. Borchert, T. Identification of molecular markers for the flower type in the ornamental crop *Calluna vulgaris* / Т. Borchert, А. Hohe // Euphytica. – 2009. – Vol. 170. – P. 203–213.
6. Phylogenetic Classification of *Ericaceae*: Molecular and Morphological Evidence /

А. Kron [et al.] // Botanical Review. – 2002. – Vol. 68, № 3. – P. 335–423.

7. Phylogenetic Relationships in the Order Ericales: Analyses of Molecular Data from Five Genes from the Plastid and Mitochondrial Genomes / A.A. Anderberg [et al.] // Am. J. of Botany. – 2002. – Vol. 89, № 4. – P. 677–687.

8. Gillespie, E. Molecular phylogenetic relationships and a revised classification of the subfamily *Ericoideae* (*Ericaceae*) / E. Gillespie, K. Kron // Mol. Phylogenetics and Evolution. – 2010. – Vol. 56. – P. 343–354.

9. Rendell, S. Chloroplast DNA diversity in *Calluna vulgaris* (heather) populations in Europe / S. Rendell, R.A. Ennos // Mol. Ecology. – 2002. – Vol. 11. – P. 69–78.

Дата поступления статьи 5 августа 2013 г.

ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

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

Введение

Анализ ДНК с помощью метода ПЦР в реальном времени широко используется аккредитованными лабораториями с целью количественного определения генетически модифицированных составляющих (далее – ГМС) в продуктах питания и кормах. В Республике Беларусь, где законодательством по маркировке продуктов, содержащих ГМС (далее – ГМ-продуктов), не предусмотрено их количественное определение, этот метод применяется во многих лабораториях при проведении скрининговых исследований для выявления генетических элементов, используемых при создании генетически модифицированных организмов (далее – ГМО), например, 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Несмотря на существенно более высокую стоимость наборов реактивов для ПЦР в реальном времени по сравнению с тест-системами для детекции ГМС стандартным методом [1] (ПЦР + электрофорез), его использование позволяет сократить трудозатраты, не требует специального отдельного помещения для проведения электрофореза продуктов амплификации и регистрации полученных результатов. Однако разная чувствительность этих методов может стать причиной расхождения результатов анализа, полученных с их применением.

В связи с образованием Таможенного союза ЕврАзЭС рассматривается вопрос о переходе Беларуси на систему маркировки ГМ-продуктов, принятую в Российской Федерации (она аналогична той, что применяется в Евро-

пейском Союзе). Законодательством Российской Федерации установлен минимальный порог 0,9% на присутствие в сырье, продуктах и кормах технически неизбежных примесей биологического материала зарегистрированных трансгенных линий относительно аналогов традиционной селекции (немодифицированных), превышение которого требует обязательной маркировки соответствующих продуктов, сырья и кормов. Наличие системы государственной регистрации трансгенных линий для потребления и переработки и порогового уровня предполагает не только детекцию определенных регуляторных элементов, характерных для ДНК большинства ГМО (как это делается в Беларуси), а идентификацию конкретных трансгенных линий и количественное определение их относительного содержания в продукте. Использование метода ПЦР для количественного определения ГМС имеет свои особенности, которые необходимо учитывать, внедряя его в практику аккредитованных лабораторий по детекции ГМО в Беларуси.

Целью настоящего исследования является определение вариации показаний при количественном определении содержания ГМС в сое и кукурузе с помощью метода ПЦР в реальном времени, оценка точности метода, рассмотрение ряда методических особенностей его применения для детекции и количественного определения ГМС, касающихся корректной интерпретации полученных результатов.

Материалы и методы

В качестве материала для анализа использовали сертифицированные материалы производства Института референсных материалов ЕС (Institute for reference materials and mea-

surements JRC, Directorate-General EC): ERM 410a – соевая мука, содержащая менее 0,03% трансгенной сои линии GTS40-3-2; ERM 410c – соевая мука, содержащая 0,5% трансгенной

сои линии GTS 40-3-2; ERM 410e – соевая мука, содержащая 2,0% трансгенной сои линии GTS 40-3-2; ERM 410f – соевая мука, содержащая 5,0% трансгенной сои линии GTS 40-3-2; ERM 413a – кукурузная мука, содержащая менее 0,02% трансгенной кукурузы линии MON 810; ERM 413c – кукурузная мука, содержащая 0,5% трансгенной кукурузы линии MON 810; ERM 413d – кукурузная мука, содержащая 1,0% трансгенной кукурузы линии MON 810; ERM 413f – кукурузная мука, содержащая 5,0% трансгенной кукурузы линии MON 810. Для анализа также был использован произвольный образец с неидентифицированными трансгенными линиями и заранее неизвестным содержанием ГМС – соевый шрот (получен на Смоленском комбикормовом заводе 30.03.2006). При проведении исследований стандартным методом [1] дополнительно использовали ERM 413b (кукурузная мука, содержащая 0,1% трансгенной линии MON810), ERM 411b (кукурузная мука, содержащая 0,1% трансгенной линии VT176) и ERM410b (соевая мука, содержащая 0,1% трансгенной линии GTS40-3-2).

Для детекции ГМС и их количественного определения использовали наборы реагентов «АмплиКвант ГМ соя-FL» и «АмплиКвант ГМ кукуруза-FL» (производитель Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Российская Федерация). Эти наборы позволяют определить относительное содержание ГМС в продуктах путем сравнения числа пороговых циклов Ct (расчета dCt) для 35S промотора вируса мозаики цветной капусты и видоспецифических белков сои и куку-

рузы (ВК – внутренний контроль). В данные наборы входят (соответственно) стандартные образцы ДНК, выделенные из референсных материалов сои линии GTS 40-3-2 (0,1%, 1,0%, 5,0%) и кукурузы MON810 (0,1%, 1,0%, 5,0%), которые предназначены для построения калибровочных прямых. Выделение ДНК производили с помощью набора реагентов «ДНК-сорб-С» (производитель Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Российская Федерация). Для анализа ДНК использовали амплификатор и программное обеспечение iCyclerIQ (производства BIO-RAD, США). Режим амплификации – согласно рекомендациям производителя набора реактивов. Повторность измерений по опыту – 2.

Статистическая обработка полученных результатов включала определение средних значений dCt, дисперсии и коэффициента вариации dCt. Точность опыта оценивали по формуле $Cs = V : \sqrt{n}$ [2], где V – коэффициент вариации dCt, n – число повторностей. Достоверность различий между значениями dCt разных образцов оценивали с помощью критерия t Стьюдента.

Для детекции ГМС стандартным методом (ПЦР + электрофорез) [1] использовали набор реактивов «АмплиСенс Плантскрин» (производитель Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Российская Федерация), позволяющий выявлять последовательности ДНК 35S промотора вируса мозаики цветной капусты и видоспецифических белков сои и кукурузы.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты анализа названных выше образцов сои. Коэффициент корреляции калибровочной прямой в данном эксперименте составил $r^2 = 0,9781$, что больше допустимого значения (0,97). Это означает, что

полученные результаты принимаются, перестановка опыта не требуется. Отсутствие флюоресценции на обоих каналах и в двух повторностях отрицательного контроля также свидетельствуют о корректности полученных результатов.

Таблица 1

Результаты детекции и количественного определения ГМС в образцах сои ($r^2 = 0,9781$)

№ п/п	Название образца	35S Ct	ВК Ct	dCt	Среднее dCt	Стандартное отклонение dCt	V, %	Содержание ГМС, %
1	ERM410a: менее 0,03%	34,6	19,5	15,10	15,05	0,07	0,46	0,00
2	ERM410a: менее 0,03%	34,7	19,7	15,00				

Продолжение табл. 1

№ п/п	Название образца	35S Ct	ВК Ct	dCt	Среднее dCt	Стандартное отклонение dCt	V, %	Содержание ГМС, %
3	ERM410с: 0,5%	28,5	20	8,50	8,65	0,21	2,43	0,55
4	ERM410с: 0,5%	28,1	19,3	8,80				
5	ERM410е: 2,0%	26,2	19,4	6,80	6,55	0,35	5,34	2,79
6	ERM410е: 2,0%	26,0	19,7	6,30				
7	ERM410f: 5,0%	24,7	18,6	6,10	6,10	0,00	0,00	3,95
8	ERM410f: 5,0%	24,6	18,5	6,10				
9	Соевый шрот	23,7	22,3	1,40	1,35	0,07	5,19	158,2
10	Соевый шрот	23,6	22,3	1,30				
11	St 0,1%	34,7	24,3	10,40	10,95	0,78	7,12	0,09
12	St 0,1%	35,5	24	11,50				
13	St 1,0%	31,6	24,4	7,20	7,45	0,35	4,70	1,38
14	St 1,0%	31,6	23,9	7,70				
15	St 5,0%	31,1	25,2	5,90	6,10	0,28	4,59	3,95
16	St 5,0%	29,8	23,5	6,30				
17	Полож. К	31,3	23,4	7,90	7,85	0,07	0,89	1,02
18	Полож. К	31,6	23,8	7,80				
19	Отрицат. К	–	–	–	–	–	–	–
20	Отрицат. К	–	–	–	–	–	–	–

Анализ полученных данных показывает, что в целом по опыту коэффициент вариации для отдельных образцов не превышал 7,12% (стандартный образец 0,1% ГМС). Соответственно, точность определения средней величины dCt была также достаточно высокой: $C_s = V : \sqrt{n} = 7,12 : 1,414 = 5,03$. Точность средних показателей, которыми оценивают результаты наблюдений, считается удовлетворительной, если коэффициент C_s не превышает 5% [2]. Тем не менее, вариация в повторностях была такова, что различия между образцами в 0,4–0,5% могли быть недостоверны. Так, недостоверны при $P = 0,05$ были различия dCt образцов ERM 410b (соевая мука, содержащая 0,1% трансгенной сои линии GTS40-3-2) и ERM 410с (соевая мука, содержащая 0,5% трансгенной сои линии GTS 40-3-2) ($t = 4,04$; $t_{05} = 4,3$ при $k = 2$), а также образцов ERM 410с (0,5% трансгенной сои линии GTS40-3-2) и ERM 410d (1,0% трансгенной сои линии GTS40-3-2): $t = 4,17$ ($t_{05} = 4,3$). В то же время достоверные различия были отмечены между образцами ERM 410а (менее 0,03% ГМС) и ERM 410b (0,1% ГМС): $t = 7,45$ ($t_{05} = 4,3$).

Особенностью данного опыта является то, что в качестве анализируемых образцов брали стандартные образцы с известной концентрацией ГМС. Это дало возможность наглядно оценить точность оценок процента ГМС в образцах, основанное на методе наименьших квадратов (построение калибровочной прямой), используя стандартное программное обеспечение к прибору. Как видно из табл. 1, относительно точные результаты получены для образцов ERM 410а – 0,00%, реальное содержание ГМС – менее 0,03%; ERM 410b (St 0,1%) – 0,09%, реальное содержание ГМС – 0,1%; ERM 410с – 0,55%, реальное содержание ГМС – 0,5% и ERM 410d (положительный контроль) – 1,02%, реальное содержание ГМС – 1,0%. В остальных случаях (для образцов с содержанием ГМС более 1%) погрешность была весьма значительной: ERM 410е – 2,79% (реальное 2,0%); ERM 410f – 3,95% (реальное 5,0%). Содержание ГМС в образце St 1,0% получилось равным 1,38. Значение ГМС в соевом шроте очевидно соответствует 100% (использованный метод дает, согласно данным [3], относительно

точные результаты в пределах от 0,1 до 5% содержания ГМС в анализируемом образце).

В табл. 2 представлены результаты анализа образцов кукурузы. Коэффициент корреляции калибровочной прямой в данном эксперименте составил $r^2 = 0,9994$, что больше допустимого значения (0,97). Это означает, что полученные результаты принимаются, перестановка опыта не требуется. Отсутствие флюоресценции на обоих каналах и в двух повторностях отрицательного контроля также свидетельствуют о корректности полученных результатов.

В отличие от результатов исследования образцов из сои, при анализе образцов из кукурузы коэффициент вариации для отдельных образцов был достаточно высок: стандартный образец 0,1% ГМС – 12,55%; стандартный образец 1,0 ГМС – 8,23%. Соответственно, точность (Cs) определения средней величины dCt для этих образцов была ниже, чем для остальных образцов кукурузы и сои: 8,87% и 5,82%.

Сравнение полученных результатов определения содержания ГМС в исследуемых образцах с их реальным содержанием (согласно спецификации изготовителя) выявило весьма

существенные расхождения для ряда образцов. Так, для образца ERM413c (0,5% ГМС) получен результат 0,26%, для образца ERM413d (1,0% ГМС) получен результат 0,69%, для образца ERM413f (5,0% ГМС) – результат 2,4%. Заметим, правда, что в отличие от результатов исследования образцов из сои, в данном эксперименте получены более точные оценки стандартных образцов (St0,1%, St1,0% и St5,0%) – 0,10%, 1,06% и 4,84% соответственно. Об этом свидетельствует также более высокий коэффициент корреляции калибровочной прямой $r^2 = 0,9994$.

Вариация в повторностях была такова, что различия между образцами в 0,4% могли быть недостоверны. Так, недостоверны при $P = 0,05$ были различия dCt образцов ERM 413b (0,1% трансгенной кукурузы линии MON 810) и ERM 413c (0,5% ГМС): $t = 1,54$ ($t_{05} = 4,3$); ERM 413c (0,5% ГМС) и ERM 413d (1,0% ГМС): $t = 2,07$ ($t_{05} = 4,3$). Достоверные различия были отмечены между образцами ERM 413a (менее 0,02% ГМС) и ERM 413b (0,1% ГМС): $t = 5,8$ ($t_{05} = 4,3$); ERM 413c (0,5% ГМС) и St 1,0% (ERM 413d): $t = 4,77$ ($t_{05} = 4,3$).

Таблица 2

Результаты детекции и количественного определения ГМС в образцах кукурузы ($r^2 = 0,9994$)

№ п/п	Название образца	35S Ct	БК Ct	dCt	Среднее dCt	Стандартное отклонение dCt	V, %	Содержание ГМС, %
1	ERM413a: менее 0,02%	33,3	18,9	14,40	14,05	0,49	3,48	0,00
2	ERM413a: менее 0,02%	33,1	19,4	13,70				
3	ERM413c: 0,5%	27,2	19,3	7,90	7,75	0,21	2,71	0,26
4	ERM413c: 0,5%	26,8	19,2	7,60				
5	ERM413d: 1,0%	27,3	20,9	6,40	6,50	0,14	2,15	0,69
6	ERM413d: 1,0%	27,5	20,97	6,60				
7	ERM413f: 5,0%	23,3	18,4	4,90	4,90	n = 1	0,00	2,40
8	St 0,1%	30,7	20,9	9,80	9,00	1,13	12,55	0,10
9	St 0,1%	29,7	21,5	8,20				
10	St 1,0%	27,0	21,4	5,60	5,95	0,49	8,23	1,06
11	St 1,0%	28,2	21,9	6,30				
12	St 5,0%	25,6	21,6	4,00	4,00	0,00	0,00	4,84
13	St 5,0%	24,3	20,3	4,00				
14	Отрицат. К	–	–	–	–	–	–	–
15	Отрицат. К	–	–	–	–	–	–	–

Таким образом, точность количественной оценки содержания ГМС с помощью метода ПЦР в реальном времени (по калибровочной прямой) в целом невысокая. Аналогичные результаты были получены во время испытания метода в ряде лабораторий [3]. Точность количественного определения ГМС, очевидно, можно повысить путем увеличения числа повторностей. Но это приведет к существенному удорожанию исследований. ГОСТ 53244-2008 (на основе международного стандарта ISO 21570:2005) [3] рекомендует использовать при проведении исследований этим методом минимальное количество повторностей каждого образца, равное двум. Следовательно, для вынесения обоснованного заключения о том, превышает ли содержание ГМС в анализируемом образце установленное пороговое значение 0,9%, необходимо определить с помощью методов статистики, достоверно ли значение содержания ГМС в образце превышает этот порог. Однако такие расчеты не предусмотрены программным обеспечением приборов и методическими указаниями к применяемым тест-системам. Они не приведены также в действующем стандарте [3] и методических указаниях [4].

Статистическая обработка полученных данных должна включать расчет ошибки полученного среднего содержания ГМС образца и определение с помощью критерия *t* Стьюдента достоверности отличия ее от 0,9% (при $P = 0,05$) для образцов, содержание ГМС в которых превышает это пороговое значение. При этом следует иметь в виду, что пороговое значение 0,9%, с которым сравнивают среднюю содержание ГМС в образце, не имеет квадратической ошибки, поэтому разность между этой средней и 0,9 оценивается только через ее ошибку [5].

Значительная часть аккредитованных лабораторий по детекции ГМО в Беларуси использует метод ПЦР в реальном времени в скрининговых исследованиях для выявления ГМС в пищевых продуктах, продовольственном сырье и кормах. При этом отмечены случаи обнаружения положительных проб в образцах, при исследовании которых стандартным методом (ПЦР + электрофорез) [1] ГМС выявлены не были. Использование стандартного метода [1] позволяет выявлять ГМС в концентрации 0,1% (см. рис.)

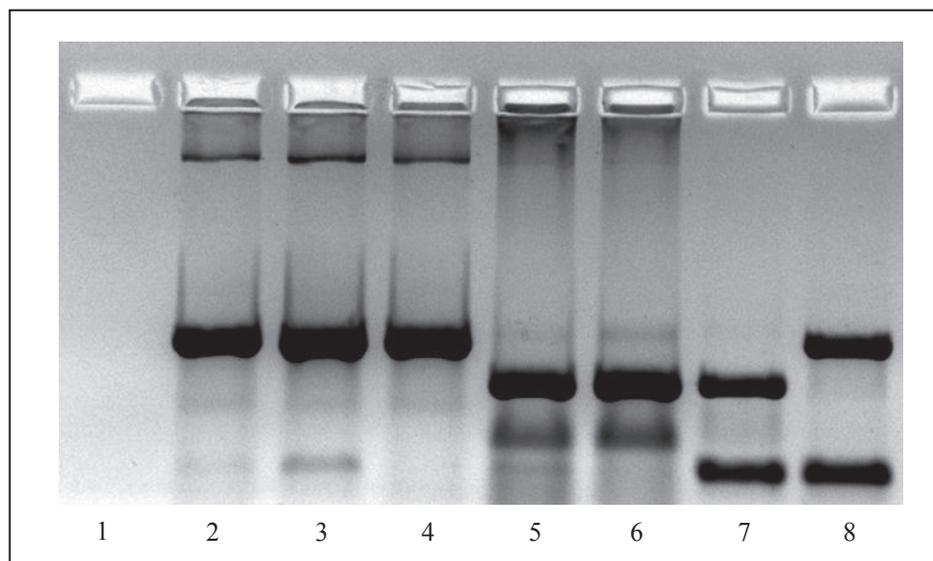


Рис. Результаты исследования стандартным методом (ПЦР + электрофорез) [1] референсных материалах сои и кукурузы с различным содержанием ГМС на предмет выявления повторности ДНК, специфичной для 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (нижняя полоса на электрофореграммах) и видоспецифических генов сои и кукурузы (верхняя – полоса). 1 – отрицательный контроль (дистиллированная вода), 2 – ERM 413b (кукуруза, содержащая 0,1% MON810), 3 – ERM 411b (кукуруза, содержащая 0,1% VT176), 4 – ERM 413a (кукуруза, содержащая менее 0,02% MON810), 5 – ERM410b (соя, содержащая 0,1% GTS40-3-2), 6 – ERM413a (соя, содержащая менее 0,03% GTS40-3-2), 7 – соя, положительный контроль (1,0% GTS40-3-2), 8 – кукуруза, положительный контроль (1,0% MON810). Метод позволяет выявлять ГМС в концентрации 0,1% и выше (дорожки 2, 3, 5, 7 и 8)

В то же время чувствительность метода ПЦР в реальном времени значительно выше. Как видно из табл. 1 и 2, увеличение интенсивности флюоресценции с праймерами, специфичными для 35S вируса мозаики цветной капусты, наблюдали даже у образцов ERM 410a (соевая мука, содержащая менее 0,03% трансгенной сои линии GTS40-3-2) и ERM 413a (кукурузная мука, содержащая менее 0,02% трансгенной кукурузы линии MON 810), практически не содержащих ГМС. В случае, если скрининговые исследования проводятся с помощью ПЦР в реальном времени без определения количественного содержания ГМС (без параллельного анализа референсных материалов с целью построения калибровочной кривой) такие образцы могут быть ошибочно отнесены к положительным пробам.

Для того, чтобы избежать ложно положительных результатов, а также соотнести полученные результаты с результатами анализа, проводимого с помощью стандартного метода

(ПЦР + электрофорез), предлагается два подхода. 1. Когда скрининговые исследования проводятся с количественной оценкой ГМС (с построением калибровочной кривой), средние содержания ГМС в предположительно положительных пробах следует сравнить с 0,1% (чувствительностью стандартного метода). Положительными могут считаться пробы, средняя содержания ГМС которых достоверно (при $P = 0,05$) превышает 0,1%. 2. В тех случаях, когда скрининговые исследования проводятся без количественной оценки ГМС (которая, собственно, не требуется; это позволяет снизить себестоимость исследований), предлагается использовать в качестве положительного контроля соответствующие референсные материалы (соя или кукурузы), содержащие 0,1% ГМС. В частности, можно рекомендовать использовать для этих целей ERM 410b (соя) и ERM 413b (кукуруза). Положительными могут считаться пробы, dCt которых достоверно (при $P = 0,05$) превышает dCt такого положительного контроля.

Заключение

1. Определение вариации показаний при количественном определении содержания ГМС в образцах референсных материалов трансгенной сои и кукурузы методом ПЦР в реальном времени показало, что точность метода в целом невысокая. Недостоверными могут быть различия между образцами в 0,4–0,5%. Следовательно, для вынесения обоснованного заключения о том, превышает ли содержание ГМС в анализируемом образце установленное пороговое значение 0,9%, необходимо определить с помощью методов статистики, достоверно ли значение содержания ГМС в образце превышает этот порог.

2. Метод ПЦР в реальном времени обладает более высокой чувствительностью по сравнению со стандартным методом ПЦР + электрофорез. Для того, чтобы избежать ложно положительных результатов, а также соотне-

сти полученные этими методами результаты, предлагается считать положительными пробы, средняя содержания ГМС которых достоверно (при $P = 0,05$) превышает 0,1% (чувствительность метода ПЦР + электрофорез). В тех случаях, когда скрининговые исследования проводятся без количественной оценки ГМС, предлагается использовать в качестве положительного контроля соответствующие референсные материалы (соя или кукурузы), содержащие 0,1% ГМС. Положительными могут считаться пробы, dCt которых достоверно (при $P = 0,05$) превышает dCt такого положительного контроля.

Автор выражает благодарность канд. биол. наук В.И. Лукаша (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси) за проведение анализов использованных в работе образцов.

Список использованных источников

1. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения: СТБ ГОСТ Р 52173-2005. – Режим доступа: <http://www.tnra.by>. – Дата доступа: 2.09.2013.

2. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – С. 87.

3. Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на

количественном определении нуклеиновых кислот: ГОСТ 53244-2008 (ИСО 21570: 2005). – Режим доступа: [http:// www.docs.pravo.ru](http://www.docs.pravo.ru). – Дата доступа: 2.09.2013.

4. Методы идентификации и количественного определения генно-инженерно-модифицированных организмов раститель-

ного происхождения: МУК 4.2 2304-07. – Введ. 30.11.2007. – Режим доступа: [http:// www.OpenGost.ru](http://www.OpenGost.ru). – Дата доступа: 2.09.2013.

5. Вольф, В.Г. Статистическая обработка опытных данных / В.Г. Вольф. – М.: Колос, 1966. – С.108.

Дата поступления статьи 11 сентября 2013 г.

О.Г. Бабак¹, Н.А. Некрашевич¹, А.М. Добродькин², И.Г. Пугачева², М.М. Добродькин², А.В. Кильчевский¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ ГИБРИДОВ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) И ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОЯВЛЕНИЯ ГЕТЕРОЗИСА

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

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

²УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»

Республика Беларусь, 213010, г. Горки, ул. Мичурина, 5

Введение

Гетерозисные гибриды F_1 являются основным посевным материалом в современном производстве сельскохозяйственных культур, в связи с чем селекция на гетерозис и изучение закономерностей подбора родительских пар остается актуальным направлением многих селекционных программ.

Способам отбора форм и линий с высокой степенью генетической удаленности, а также методам оценки способности форм проявлять гетерозис посвящен широкий ряд исследований. Установленные еще в первой половине XX века тесные связи между эффектом гетерозиса и использованием инбредных линий в качестве родителей объясняются в классической генетике тремя основными гипотезами (доминированием, сверхдоминированием и эпистазом), широко описанными в литературе.

Использование молекулярных маркеров позволило изучить связь между генетической гетерогенностью родительских форм и проявлением гетерозиса. Для оценки генетического разнообразия селекционного материала широко используются ISSR- (Inter-Simple Sequence

Repeat) и SSR- (Simple Sequence Repeat) маркеры, для которых характерны воспроизводимость результатов и достаточно высокая информативность. В результате ряда выполненных работ было установлено, что для получения гибридов с выраженным гетерозисным эффектом в схемах скрещиваний необходимо использовать генотипы с высокой степенью генетической дивергенции. Однако подобные эксперименты имеют переменный успех. Так в работах Barth (2003), Meyer (2004) наблюдалось отсутствие связей между генетической дистанцией родительских форм и эффектом гетерозиса [1].

В связи с вышеизложенным, целью исследований являлось изучение молекулярно-генетической гетерогенности используемых родительских форм томата с помощью ISSR- и SSR- маркеров и установление связи между уровнем полиморфизма с эффектом гетерозиса у гибридов F_1 по хозяйственно-ценным признакам, а также оценка возможности прогноза продуктивности гибридов на основе анализа дивергенции родителей.

Материалы и методы

Материалом для исследований генетической гетерогенности родительских форм с помощью молекулярных маркеров были 16 селекционных линий томата, созданных совместно с УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия». Для изучения особенностей гетерозиса по хозяйственно-важным признакам были созданы гибриды F_1 томата по схеме топкросса (6×10), где в качестве материнских форм были использованы Линия Б-3-1-8, Линия – С-9464, Линия 19/5,

Линия 178, Линия 179, Линия 182, а в качестве отцовских – Линия 89/0, Линия 89/1, Линия 100/1, Линия 100/2, Линия 94/0, Линия 95/0, Линия 93/1, Линия 93/2, Линия 98/0, Wilko.

Выделение ДНК 16 образцов томата проводили с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» (Fermentas).

Для оценки ДНК-полиморфизма использовали девять ISSR- (табл. 1) и 11 SSR-маркеров (табл. 2), наиболее информативных и локализованных на разных хромосомах [2, 3].

Таблица 1

Перечень используемых ISSR-праймеров

№ п/п	Название праймера	Последовательность
1	ISSR-4	(AC) ₈ AG ₂
2	ISSR-8	(ATG) ₆
3	ISSR-9	(CTC) ₆
4	ISSR-10	(GAA) ₆
5	ISSR-17	(GACA) ₄
6	ISSR-23	(AC) ₈ TA
7	ISSR-22	(AC) ₈ AA
8	ISSR-24	(AC) ₈ TC
9	ISSR-9A	(CTC) ₆ AA

ПЦР-реакцию проводили при использовании амплификатора TProfessional (Biometra). Условия амплификации отображены в табл. 3. Электрофоретическое разделение продук-

тов полимеразной цепной реакции проводили в 1,7%-ном агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Электрофорез проводили при температуре + 4 °С в течение 3 ч при напряжении 75 В.

Таблица 2

SSR-маркеры, применяемые для выявления генетического полиморфизма родительских форм томата

№	Локус	Последовательность праймеров	Метка, 5'
1	Est 253712	GAAATGAAGCTCTGACATCAA	FAM
		TCATTGCTTGCATATGTTTCATG	
2	Leef 1Aa	AAATAATTAGCTTGCCAATTG	FAM
		CTGAAAGCAGCAACAGTATTT	
3	LEMDDNa	ATCAAGGAACTTTTAGCTCC	TAMRA
		TGCATTAAGGTTCCATAAATGA	
4	LELE 25	TTCTCCGTATGAGTGAGT	ROX
		CTCTATTACTTATTAATATCG	
5	TOM 210	CGTTGGATTACTGAGAGGTTTA	R6G
		ACAAAAATTCACCCACATCG	
6	JACKP 1	GGAGGTCATGGTTTTAAGGTG	FAM
		CTGTCTGTCAAACCTGTTTGC	
7	SSR 63	CCACAACAATTCCATCTCA	TAMRA
		GCTTCCGCCATACTGATACG	
8	LE 20592	CTGTTTACTTCAAGAAGGCTG	ROX
		ACTTTAACTTTATTAATGCCACG	
9	Tms 9	TTGGTAATTTATGTTTCGGGA	FAM
		TTGAGCCAATTGATTAATAAGTT	
10	TOM 47-48	CAAGTTGATTGCATTACCTATTG	R6G
		TACAACAACATTTCTTCTTCTT	
11	Tms 63	GCAGGTACGCACGCATATAT	TAMRA
		GCTCCGTCAGGAATTCTCTC	

Таблица 3

Описание условий протекания ПЦР для амплификации с ISSR-праймерами

Этап		T, °C	t, сек
	1. Денатурация	94	240
34x	2. Денатурация	94	50
	3. Отжиг	T _о	50
	4. Элонгация	72	70
	5. Элонгация	72	560
	6. Охлаждение	16	600

Результаты анализа продуктов амплификации (ISSR-анализ) документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя в качестве маркера 1,5 kb DNA ladder (GeneRuler, Fermentas).

Анализ флуоресцентно-меченых ПЦР-фрагментов (SSR-анализ) проводился на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 (США), размер продуктов амплификации определяли с применением размерного стандарта молекулярного веса S450 (Синтол). Полученные данные анализировали с помощью пакета прикладных программ GeneMapper Software Version 4.1.

Построение дендрограммы генетического сходства проводилось с использованием программы Treeconw, методом невзвешенного парно-группового кластерного анализа арифметическим усреднением (UPGMA).

По результатам молекулярного анализа проведено скрещивание форм томата по схеме топкросса (6 × 10). Изучаемые образцы выращивались в 2012 году в пленочных теплицах в 3-х кратной повторности по 5 растений на делянке. Схема посадки 70х30 см. Доза удобрений N₆₀ (P₂O₅)₁₂₀ (K₂O)₁₂₀. Агротехни-

ка – общепринятая для томата защищенного грунта. Оценку достоверности полученных результатов по учитываемым биометрическим признакам проводили методом дисперсионного анализа.

Истинный гетерозис находили по формуле:

$$\Gamma_{\text{ист.}} = ((3П Г - 3П P_{\text{max}}) / 3П P_{\text{max}}) * 100\%,$$

где 3П Г – значение признака гибрида;

3П P_{max} – значение признака лучшей родительской формы.

Гипотетический гетерозис рассчитывали по формуле:

$$\Gamma_{\text{ист.}} = ((3П Г - 3П (P_1 + P_2) / 2) / 3П(P_1 + P_2) / 2) * 100\%,$$

где 3П (P₁ + P₂) / 2 – среднее значение признака у родительских форм [4].

Для выявления связей между эффектами гетерозиса по биометрическим признакам у гибридов F₁ проведен корреляционный анализ между генетической дистанцией и признаками продуктивности (ранний урожай, товарный урожай, общий урожай, масса плода).

Результаты и обсуждение

Оценка степени генетической дивергенции генотипов с помощью девяти ISSR-маркеров показала, что используемые праймеры дали воспроизводимый результат по всем изучаемым образцам томата. В среднем у образцов один праймер инициировал синтез 5–7 фрагментов ДНК. Зона распределения амплифицируемых фрагментов находилась в диапазоне 120–1600 п.н.

Максимальное количество полиморфных фрагментов (10) получено в результате амплификации с праймером ISSR-4, зона распределения которых находилась в области 300–1600 п.н. (рис.1)

Для выявления межлинейного полиморфизма наиболее информативными оказались праймеры ISSR-22 и ISSR-24. В результате амплификации с межмикросателлитным

маркером ISSR-22 синтезировались дополнительные фрагменты у образцов Линия 182, Линия 100/1, Линия Б-318. Уникальный для этих линий фрагмент находился на уровне

480 п.н. У образцов Линия 16/5 и Линия С9464 отсутствовал характерный для других родительских форм фрагмент на уровне 600 п.н. (рис. 2).

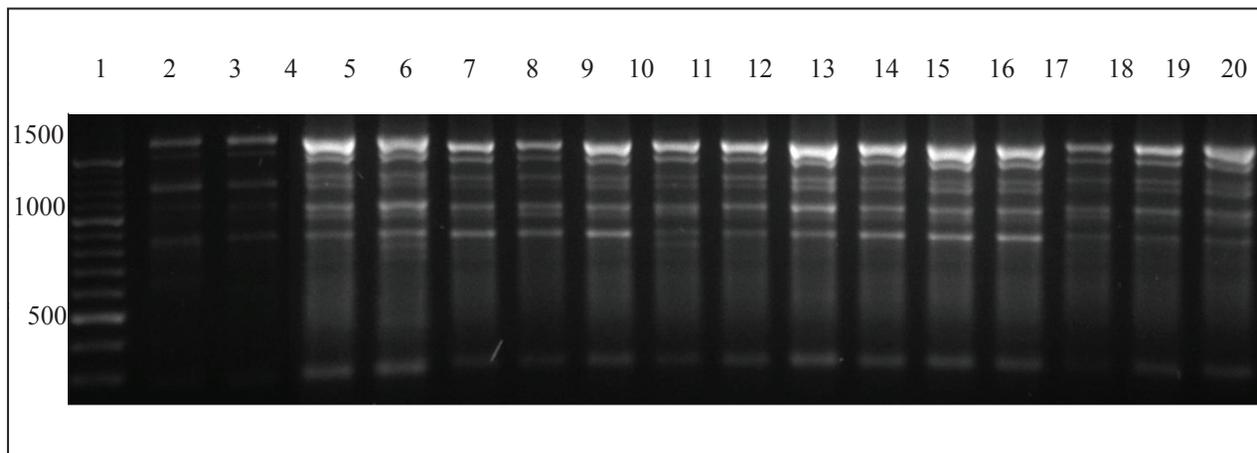


Рис. 1. Продукты амплификации ДНК с праймером ISSR-4: 1 – маркер молекулярного веса; 2, 3 – Wilko; 4, 5 – Линия 89/0; 6–8 – Линия 178; 9–11 – Линия 179; 12–14 – Линия 182; 15–17 – Линия 89/1

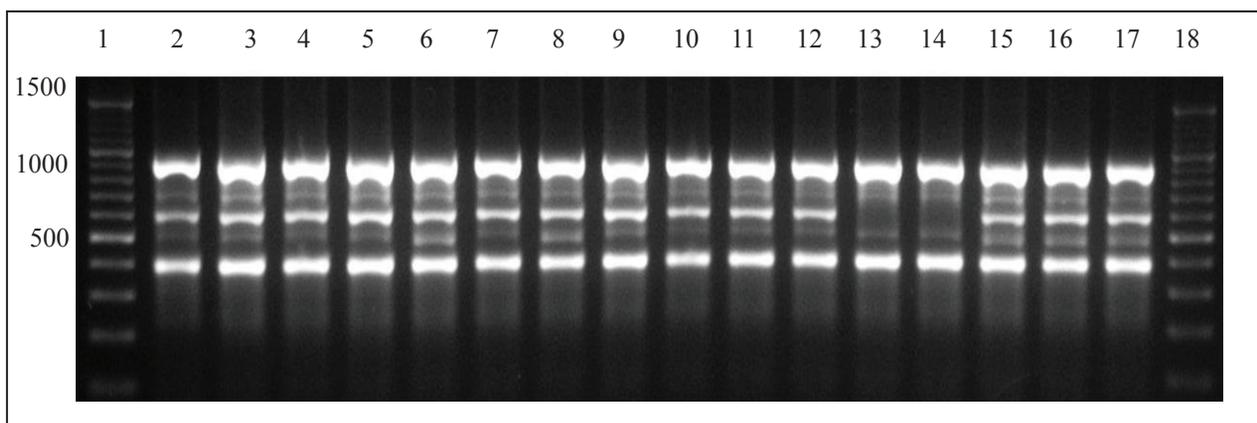


Рис. 2. Продукты амплификации ДНК с праймером ISSR-22: 1, 18 – маркер молекулярного веса; 2 – Wilko; 3 – Линия 89/0; 4 – Линия 178; 5 – Линия 179; 6 – Линия 182; 7 – Линия 89/1; 8 – Линия 100/1; 9 – Линия 98/0; 10 – Линия 94/0; 11 – Линия 100/2; 12 – Линия 95/0; 13 – Линия 93/1; 14 – Линия 93/2; 15 – Линия 19/5; 16 – Линия С 9464; 17 – Линия Б-318

У остальных используемых маркеров был отмечен более низкий уровень полиморфизма в исследуемой коллекции генотипов. Характер синтеза фрагментов при амплификации ДНК с большинством ISSR-праймеров был сходным у изучаемых генотипов.

Наряду с ISSR-анализом, для выявления генетического полиморфизма изучаемых образцов использовался микросателлитный анализ с помощью одиннадцати SSR-маркеров, наиболее информативных и локализованных на разных хромосомах. По результатам анализа микросателлитных локусов в изучаемой вы-

борке родительских форм томата маркер Leef 1Aa оказался наиболее информативным. Всего было выявлено пять аллельных вариантов локуса в пределах 199–217 п.н. Размер наиболее часто встречающегося аллеля составил 199 п.н., он был идентифицирован у восьми родительских линий. Редкий аллель размером 217 п.н. детектирован у линии С 9464.

Для микросателлитных локусов SSR 63, Est 253712 и LEMDDNa, расположенных в восьмой, шестой и пятой хромосомах соответственно, детектировано по 4 варианта аллелей. Причем наиболее часто выявленные аллели были

отмечены у большой группы родительских форм (Линия 179, Линия 89/0, Линия 89/1, Линия 178, Линия 182, Линия 100/1, Линия 98/0, Линия 94/0), что говорит о небольшой дивергенции используемого селекционного материала. Тем не менее, с помощью вышеуказанных праймеров были детектированы уникальные аллели у родительских форм томата. Так, у образца С 9464 обнаружены два уникальных аллеля: длиной 201 п.н. в локусе SSR 63 (рис. 3) и 147 п.н. в локусе Est253712. Для изучаемой формы Линия 95/0 отмечено амплифицирование уникального аллеля размером 216 п.н. при

использовании соответствующих праймеров к микросателлитному локусу LEMDDNa и достаточно редкие для нашей выборки генотипов томата аллели длиной 253 п.н. в локусе SSR 63.

Анализ локуса LELE 25 (10 хромосома) показал варьирование длин амплифицируемых фрагментов в пределах 224–228 п.н. Наиболее распространенный аллель размером 228 п.н. идентифицирован у 13 родительских линий, редкий аллель в 226 п.н. амплифицировался у близкородственных форм Линия 93/1 и Линия 93/2. Уникальный аллель составил 224 п.н. и выявлен у одного образца Линия 182.

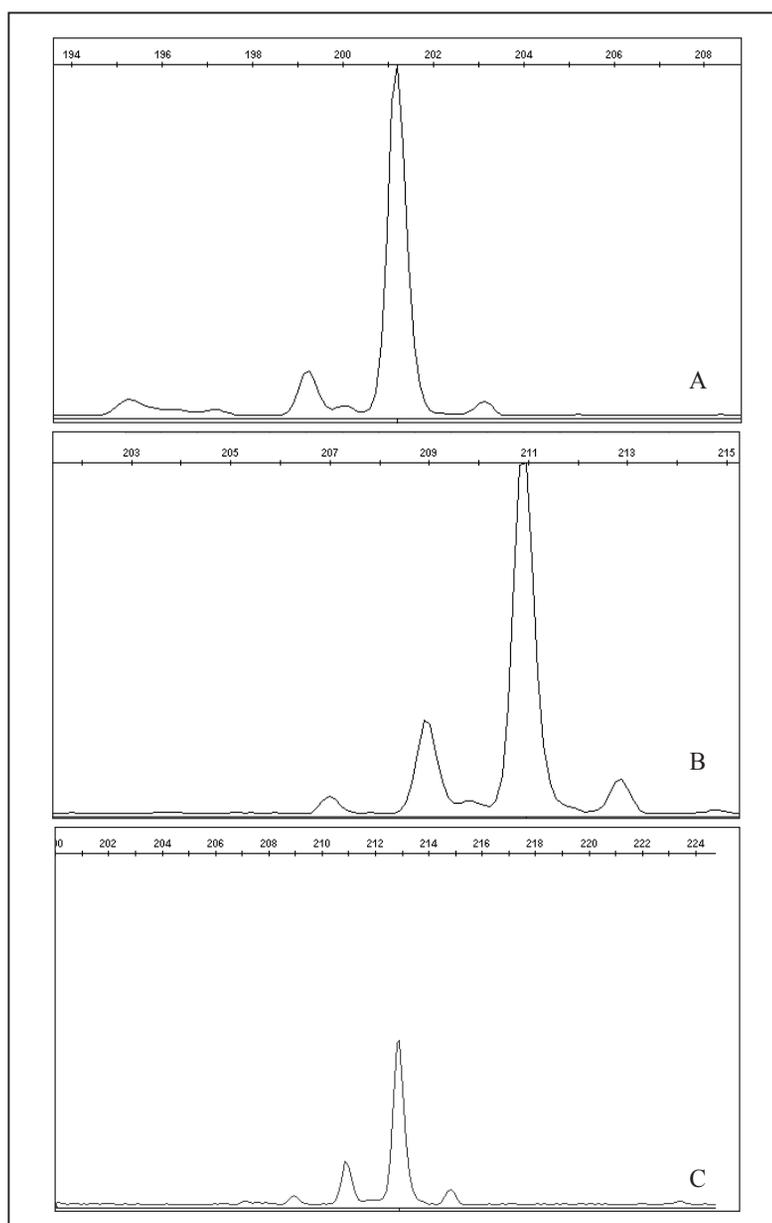


Рис. 3. Результаты амплификации ДНК родительских форм томата с праймером SSR 63: А – Линия С 9464; В – Линия 98/0; С – Линия 100/2

Микросателлитный локус Tms 63, локализованный в первой хромосоме, представлен тремя аллельными вариантами, два из которых (160 и 186 п.н) встречались достаточно часто и только у линии С 9464 амплифицировался фрагмент длиной 189 п.н. Характеристика микросателлита Tms 9 (12 хромосома) показала достаточно распространенное обнаружение всех его аллельных вариантов в изучаемой выборке родительских форм томата. Аллели размером 341 п.н. детектировались у восьми, 345 п.н. – пяти, 348 п.н. – четырех родителей. Для локуса TOM 210, локализованного на 4 хромосоме, характерно наличие двух микросателлитов: длиной 223 п.н. у большинства родительских форм и 226 п.н. у образца Линия 19/5. SSR-анализ по

локусам TOM 47-48 (3 хромосома) и LE 20592, JACKP 1, локализованным на 11 хромосоме, не выявил различия изучаемой выборки генотипов томата. Таким образом, наибольшее число редких аллелей выявлено у генотипов С 9464, Линия 19/5, Линия 95/0, Линия 93/1 и Линия 93/2, что показывает перспективность их использования в дальнейшей селекционной работе.

На основании данных полиморфизма фрагментов ДНК изучаемых родительских форм, полученных с помощью SSR-анализа, построена дендрограмма генетического сходства (рис. 4) и матрица генетических расстояний (табл. 5). Построение проводилось в программе Treesonw методом невзвешенного парно-группового кластерного анализа арифметическим усреднением (UPGMA).

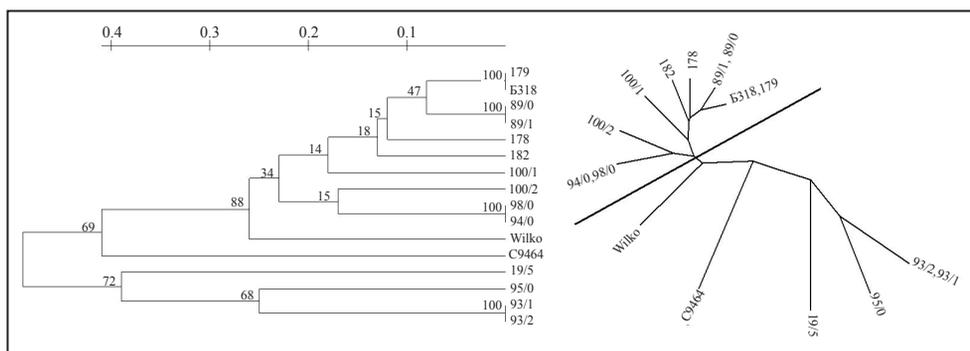


Рис. 4. Дендрограмма генетического родства родительских форм томата

Кластерный анализ позволил отметить обособленное расположение образцов Линия 95/0, Линия 19/5, Линия 93/1 и Линия 93/2. При этом образцы С9464 и Wilko также были относительно обособлены от других изучаемых форм, что

позволило нам объединить их в один кластер с вышеуказанными формами. Остальные родительские линии, генетическая дивергентность между которыми относительно слабая, были отнесены ко второму общему кластеру.

Таблица 4

Матрица генетических расстояний между родительскими формами, ев. ед.

♀ \ ♂	Л-89/0	Л-89/1	Л-100/1	Л-98/0	Л-94/0	Л-100/2	Л-95/0	Л-93/2	Л-93/1	Wilko
Б-318	5,128	5,128	17,500	17,333	17,333	24,051	48,148	55,844	55,844	26,027
С-9464	40,845	40,845	42,466	29,412	29,412	33,333	56,757	65,714	65,714	39,394
Л-19/5	35,897	35,897	47,500	52,000	52,000	44,304	25,926	37,662	37,662	42,466
Л-178	12,821	12,821	25,000	9,333	9,333	16,456	48,148	55,844	55,844	34,247
Л-179	5,128	5,128	17,500	17,333	17,333	24,051	48,148	55,844	55,844	26,027
Л-182	32,353	9,589	22,667	34,286	34,286	40,541	55,263	52,778	52,778	32,353

Для изучения особенностей проявления гетерозиса у гибридов с различной генетической дистанцией между родителями были найдены значения гипотетического (отражающего пре-

восходство гибридов по отношению к среднему значению признака между родителями) и истинного (отражающего превосходство гибридов по отношению к значению признака лучшего ро-

дителя) гетерозиса. Расчет данных показателей проводился по всей выборке, а также отдельно у гибридов, родители которых находились в одном кластере, и у гибридов, родительские формы которых находились в разных кластерах.

В целом по изучаемой гибридной схеме гипотетический гетерозис по ранней урожайности был у гибридов от -100 до 1274,1%, по общей урожайности – от -64,8 до 208,4%, по товарной урожайности – от -51,2 до 224,0%, по массе плода – от -28,9 до 244,3%. Значения истинного гетерозиса изменялись от -100,0 до 991,2 % по ранней урожайности, от -76,1 до 54,2 % по общей урожайности,

от -59,6 до 62,0 % по товарной урожайности, от -44,8 до 87,3 % по массе плода. Наибольшими значениями эффектов гетерозиса по ранней урожайности характеризовался гибрид Линия 182 × Линия 95/0, по общей и товарной - С 9464 × Линия 89/1, по массе плода - Б 3-1-8 × Wilko и Линия 182 × Wilko. Родительские формы указанных гибридов находились в различных кластерах по генетической дистанции. Полученные результаты по средним значениям гетерозиса у гибридов с относительно большой (средние в разных кластерах) и слабой (среднее в одном кластере) генетической дистанцией представлены в табл. 5.

Таблица 5

Особенности проявления гетерозиса по признакам продуктивности у гибридов с разной генетической дистанцией между родителями

Показатель	Признак	Среднее по схеме	Среднее в разных кластерах	Среднее в одном кластере
Истинный гетерозис, %	Ранняя урожайность	67,1	79,2	56,52
	Товарная урожайность	-4,8	0,0	-9,0
	Общая урожайность	-16,5	-10,4	-21,8
	Масса плода	6,75	7,69	5,92
Гипотетический гетерозис, %	Ранняя урожайность	147,3	167,9	129,2
	Товарная урожайность	31,9	42,0	23,0
	Общая урожайность	44,3	53,4	36,2
	Масса плода	48,4	54,5	43,0
Генетическая дистанция, ев. ед.		33,7	44,4	24,4

Согласно полученным данным, средние значения эффектов гетерозиса были выше у гибридов с большей генетической гетерогенностью между родителями.

Наряду со средними значениями по группам, нами проводилось ранжирование общего массива данных по товарной урожайности для изучения возможности отбора высокопродуктивных

гибридов по генетической дистанции между родителями. Данные анализа изменения признаков гипотетического и истинного гетерозиса (ГГ и ИГ), эффекта специфической комбинационной способности (СКС), генетической дистанции, рассчитанной на основе ISSR- (ГД ISSR) и SSR-(ГД SSR) маркеров. при ранжировании образцов по товарной урожайности (ТУ) представлены в табл. 6.

Таблица 6

Значения эффектов гетерозиса, специфической комбинационной способности и генетической дистанции в зависимости от товарной урожайности

Наименование образца	ТУ, кг/м ²	ГГ, %	ИГ, %	Эффект СКС	ГД-ISSR, ев.ед.	ГД-SSR, ев.ед.
Линия 19/5 × Линия 94/0	12,13	23,6	55,3	2,86	4,0	52,00
Линия 19/5 × Линия 100/2	11,23	13,1	18,2	0,95	5,1	44,30
Линия 19/5 × Линия 93/2	11,2	9	15,1	2,11	4,1	37,66
Линия 19/5 × Линия 98/0	11,11	13,7	13,7	1,97	3,0	52,00
Линия 19/5 × Линия 89/0	10,66	9,6	14,5	0,89	5,1	35,90

Продолжение табл. 6

Наименование образца	ТУ, кг/м ²	ГГ, %	ИГ, %	Эффект СКС	ГД-ISSR, ев.ед.	ГД-SSR, ев.ед.
С 9464 × Линия 89/1	10,41	62	224	2,12	5,2	40,85
Линия 19/5 × Линия 89/1	9,63	5,2	27,4	-0,01	4,1	35,90
Б 3-1-8 × Линия 95/0	9,31	53,6	207,1	1,92	5,1	48,15
С 9464 × Линия 98/0	9,15	-6	88	1,36	4,1	29,41
Линия 182 × Wilko	9	11,8	95,2	1,59	7,2	32,35
Линия 178 × Линия 100/2	8,88	3,2	24,4	1,65	2,1	16,46
Линия 19/5 × Линия 93/1	8,82	5,6	8,9	-0,76	3,0	37,66
Линия 19/5 × Линия 95/0	8,8	-6,2	13	-1,39	4,0	25,93
Линия 179 × Линия 95/0	8,78	31,9	26,5	2,02	2,1	48,15
Линия 182 × Линия 93/1	8,71	-16,3	49,1	1,13	4,0	52,78
С 9464 × Линия 100/1	8,67	13	126,1	0,68	0,0	42,47
С 9464 × Линия 93/2	8,64	-20,9	58,2	0,90	3,1	65,71
Линия 179 × Линия 100/2	8,37	-15	0,6	1,51	1,1	24,05
Линия 182 × Линия 95/0	8,36	37,8	134,5	0,18	3,0	55,26
С 9464 × Wilko	8,12	2,3	104,6	0,05	7,4	39,39
С 9464 × Линия 94/0	8,1	40,6	181,2	0,18	5,1	29,41
Линия 182 × Линия 89/1	7,97	21,1	105,7	0,33	5,1	9,59
Линия 182 × Линия 89/0	7,91	-15,6	49,8	0,14	4,0	9,59
Линия 182 × Линия 93/2	7,83	-28,9	28,8	0,74	5,1	52,78
Линия 178 × Wilko	7,79	1,3	6,3	1,42	3,2	34,25
Линия 178 × Линия 100/1	7,54	4,8	8,6	1,25	6,1	25,00
С 9464 × Линия 93/1	7,53	-13,2	73,5	-0,70	4,1	65,71
Линия 182 × Линия 100/1	7,52	-6,7	62,3	0,18	2,0	22,67
С 9464 × Линия 100/2	7,45	-11,5	77,1	-1,48	4,1	33,33
С 9464 × Линия 89/0	7,28	-14,5	71	-1,14	4,1	40,85
Б 3-1-8 × Линия 93/1	7,25	-22,6	54,8	0,46	4,1	55,84
Б 3-1-8 × Линия 100/2	7,18	-30,1	39,9	-0,31	4,1	24,05
Линия 179 × Линия 100/1	7,16	1,6	2,9	1,25	3,1	17,50
Линия 182 × Линия 98/0	7,16	-25,6	33,4	0,02	4,0	34,29
Линия 178 × Линия 93/1	7,09	-27,3	-17,8	0,56	2,1	55,84
Б 3-1-8 × Линия 89/0	6,93	-14,4	71,2	-0,05	4,1	5,13
С 9464 × Линия 95/0	6,87	12,1	124,2	-1,96	5,1	56,76
Линия 178 × Линия 89/0	6,87	-9,9	0,7	0,14	2,1	12,82
Линия 179 × Wilko	6,87	10,1	13	0,88	4,3	26,03
Б 3-1-8 × Линия 94/0	6,71	17,4	134,7	0,23	5,1	17,33
Б 3-1-8 × Линия 93/2	6,66	-27,1	45,7	0,36	3,1	55,84
Линия 19/5 × Линия 100/1	6,57	-14,3	-3,4	-2,77	1,0	47,50
Б 3-1-8 × Wilko	6,52	-11,5	77	-0,10	7,4	26,03
Линия 179 × Линия 89/0	6,38	-12,8	-4,4	0,03	1,1	5,13
Линия 178 × Линия 95/0	6,37	-2,2	2,1	-0,77	1,0	48,15
Линия 178 × Линия 94/0	6,29	11	21,9	0,06	1,0	9,33
Б 3-1-8 × Линия 89/1	6,27	32,9	165,9	-0,58	5,2	5,13
Линия 178 × Линия 98/0	5,98	-32,5	-21,6	-0,11	2,1	9,33

Продолжение табл. 6

Наименование образца	ТУ, кг/м ²	ГГ, %	ИГ, %	Эффект СКС	ГД-ISSR, ев.ед.	ГД-SSR, ев.ед.
Линия 182 × Линия 100/2	5,97	-43	3,2	-2,31	4,0	40,54
Б 3-1-8 × Линия 100/1	5,96	-10,3	79,3	-0,59	0,0	17,50
Линия 178 × Линия 89/1	5,66	-2,8	2,1	-0,93	1,1	12,82
Линия 19/5 × Wilko	5,58	-23,2	-14,5	-3,84	6,3	42,47
Линия 179 × Линия 93/1	5,47	-36,4	-29,4	-0,69	1,1	55,84
Линия 179 × Линия 89/1	5,47	0	-3,5	-0,93	2,1	5,13
Линия 182 × Линия 94/0	5,28	-7,1	55,5	-1,99	3,0	34,29
Б 3-1-8 × Линия 98/0	5,01	-44,2	11,7	-1,34	4,1	17,33
Линия 179 × Линия 93/2	4,82	-49	-39,1	-0,84	0,0	55,84
Линия 179 × Линия 94/0	4,52	-17,7	-17	-1,33	2,1	17,33
Линия 179 × Линия 98/0	3,81	-57,2	-51,2	-1,90	1,1	17,33
Линия 178 × Линия 93/2	2,77	-59,6	-50,8	-3,27	3,2	55,84

Согласно полученным данным, наиболее урожайные 10 образцов имели достаточно высокие значения истинного и гипотетического гетерозиса, генетической гетерогенности родителей. При этом наибольшие значения генетической дистанции были характерны как для образцов с высокой, так и средней и низкой урожайностью. Полученные данные говорят, что для создания высокопродуктивных гибридов недостаточно ориентироваться на показатели генетической дивергентности, рас-

считанные на основе ISSR- и SSR-анализа.

Значение коэффициентов корреляции между генетической дистанцией родительских форм по ISSR- и SSR-маркерам и товарной урожайностью составили 0,33 и 0,25 соответственно. Отсутствие тесной сопряженности между этими параметрами ставит под сомнение возможность использования дивергенции между родителями на основе ISSR- и SSR-анализа как критерия отбора высокопродуктивных гетерозисных гибридов.

Заключение

Использование ISSR- и SSR-маркеров позволяет выявить в короткие сроки полиморфизм на уровне ДНК в селекционном материале и генетическую удаленность между изучаемыми формами.

При разделении изучаемых родительских генотипов на два кластера по генетической дивергенции выявлена тенденция к более высоким эффектам гетерозиса по признакам уро-

жайности при гибридизации генотипов, принадлежащих к разным кластерам в сравнении с гибридизацией внутри кластеров.

Выявлено отсутствие тесной сопряженности между дивергенцией родительских генотипов на основе ISSR- и SSR-анализа и товарной урожайностью гибридов, что не позволяет использовать параметры дивергенции как критерия отбора родителей высокопродуктивных гибридов.

Список использованных источников

1. Molecular marker for harnessing heterosis / G.S. Krishnan [et al.] // *Molecular markers in plants* / ed. Robert J. Henry. – Oxford, UK. – Cap. 8. – P. 119–134.
2. Pradeep Reddy, M. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding / M. Pradeep Reddy, N. Sarla, E.A. Siddiq // *Euphytica* – 2002. – № 128. – P. 9–17.

3. Сравнительный анализ полиморфизма микросателлитных маркеров генотипов томата (*Solanum Lycopersicum* L.) белорусской и зарубежной селекции // А.В. Кильчевский [и др.] / Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2010. – Т. 11. – С. 7–19
4. Мазер, К. Биометрическая генетика / К. Мазер, Дж. Джинкс. – М.: Мир, 1985. – С. 156–165.

Дата поступления статьи 28 октября 2013 г.

КОНСТРУИРОВАНИЕ *IN VITRO* РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ СИМАЗИНА

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

Введение

Широкое применение хлорированных симм-триазинов (симазин, атразин, пропазин) в качестве эффективных средств борьбы с сорняками в практике интенсивного земледелия привело к накоплению их в обрабатываемых почвах, затруднив или сделав невозможным чередование культур [1]. Эти соединения крайне медленно разлагаются естественными сообществами микроорганизмов. Поэтому проблема восстановления загрязненных симм-триазином почв остается актуальной и в настоящее время. Перспективным подходом для очистки загрязненных почв представляется применение биопрепаратов на основе микроорганизмов, осуществляющих минерализацию симм-триазинов. Для этих целей возможно также использование рекомбинантных штаммов-деструкторов [2].

Ранее из ризосферы кукурузы была изолирована бактерия *Herbaspirillum huttiense* B601, способная к деградации симм-триазиновых гербицидов благодаря присутствию генов *smzA*, *-B* и *-C*, локализованных на крупной плазмиде и гомологичных соответственно генам *atzA*, *-B*, и *-C* из *Pseudomonas* sp. ADP [3]. Известно, что плаزمиды утилизации атразина бактерии *Pseudomonas* sp. ADP перено-

сятся и экспрессируются в *E. coli* [4], а ключевые гены его деградации у различных бактерий обладают высокой степенью сходства [5]. Гены *smzA*, *-B* и *-C* при конъюгации передаются из штамма *Herbaspirillum huttiense* B601 в его Sm^z-производные как за счет мобилизации второй резидентной плазмиды меньшего размера, так и с помощью плазмиды pSa [6, 7]. Тем не менее, конъюгационный перенос способности утилизировать симазин из *H. huttiense* B601 в неродственные грамотрицательные бактерии оказался затруднительным [8]. В ходе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей установлена высокая степень сходства структурных областей *smz* и *atz* генов и выявлены существенные различия между промоторными областями генов *smzB* и *atzB* [9]. Скорее всего, именно особенности функционирования регуляторной области гена *smzB* затруднили его экспрессию в неродственных штамму *H. huttiense* B601 хозяевах и привели к невозможности утилизировать симазин при переносе *in vivo*.

Целью данной работы было получение *in vitro* рекомбинантных штаммов-деструкторов симазина и исследование экспрессии *smz* генов такими бактериями.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы бактерий: *E. coli* DH5 α , *E. coli* C600, несущий плазмиду pRK600, *Herbaspirillum huttiense* B601, *Herbaspirillum frisingense* B416, *Burkholderia* sp. 418; плазмиды: pCB182 (Ap^r) для клонирования промоторов в клетках *E. coli* [10], pBluescript II KS (+) (Ap^r) для клонирования фрагментов ДНК в клетках *E. coli* [11], самоэлиминирующийся вектор pUT-Km1 (Ap^r, Km^r) для клонирования последовательностей в пределах транспозона Tn5 и включения гибридной конструкции в хромосому различных

грамотрицательных бактерий [12]. Используемые в работе праймеры представлены в табл. 1.

Культуры *E. coli* выращивали в среде L (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 5 г/л) при 37 °С. Культуры *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* sp. выращивали в среде TY (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 1 г/л, CaCl₂ – 0,2 г/л) или среде Г (глюкоза – 4 г/л, глутаминовая кислота – 50 мг/л, KН₂РO₄ – 0,5 г/л, MgSO₄ – 0,2 г/л, NaCl – 0,2 г/л, CaCl₂ – 0,02 г/л, Fe-ЭДТА – 0,066 г/л, Na₂MoO₄ – 0,002 г/л, H₃BO₃ – 0,03 г/л,

ZnSO₄·7H₂O – 0,022 г/л, CoSO₄·7H₂O – 0,014 г/л, при 28 °С. Для получения твердых сред использовали бактериологический агар Difco (15 г/л).
CuSO₄·5H₂O – 0,001 г/л, MnCl₂·4H₂O – 0,0008 г/л

Таблица 1

Характеристика использованных в работе праймеров

Праймер	Название праймера	Оптимальная T _a , °С
ProAf	5' TTGAACCTCGGGGAACCTTCTTGA 3'	55
ProAr	5' GATATGTATCCAATAGTGTGTACACGT 3'	55
atzAfull-f	5' TGGAGACATATCATGCAAACGC 3'	55
atzAfull-r	5' AGCAACGGCGTCATTTCTAG 3'	55
PROsmzBf_1	5' GCATGTACGCCTTGCGCAT 3'	60
ProBr	5' GGTGGTTGCTCCCGTCGAATC 3'	60
pCB182f	5' GCAGAACGAAACCGTCCG 3'	55
pCB182r	5' CCTTTCATTAATACCTCTAGC 3'	55
ERIC2	5' AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG 3'	51

Культуры *E.coli* выращивали в среде L (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 5 г/л) при 37 °С. Культуры *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* sp. выращивали в среде ТУ (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 1 г/л, CaCl₂ – 0,2 г/л) или среде Г (глюкоза – 4 г/л, глутаминовая кислота – 50 мг/л, КН₂РО₄ – 0,5 г/л, MgSO₄ – 0,2 г/л, NaCl – 0,2 г/л, CaCl₂ – 0,02 г/л, Fe-ЭДТА – 0,066 г/л, Na₂МоО₄ – 0,002 г/л, Н₃ВО₃ – 0,03 г/л, ZnSO₄·7H₂O – 0,022 г/л, CoSO₄·7H₂O – 0,014 г/л, CuSO₄·5H₂O – 0,001 г/л, MnCl₂·4H₂O – 0,0008 г/л) при 28 °С. Для получения твердых сред использовали бактериологический агар Difco (15 г/л).

Исследование дехлорирования симазина штаммами *E.coli* проводили в среде следующего состава: глюкоза – 4 г/л, Na₂НРО₄ – 6 г/л, КН₂РО₄ – 3 г/л, (NH₄)₂SO₄ – 12,3 г/л, MgSO₄ – 0,12 г/л, триптон – 0,1 г/л, дрожжевой экстракт – 0,01 г/л, симазин – 1 г/л, а для штаммов *Herbaspirillum* spp. и *Burkholderia* sp. использовали среду состава: глюкоза – 4 г/л, глутаминовая кислота – 50 мг/л, К₂НРО₄ – 0,5 г/л, MgSO₄ – 0,2 г/л, CaSO₄ – 0,02 г/л, триптон – 0,1 г/л, дрожжевой экстракт – 0,01 г/л, симазин – 1 г/л.

Наработку фрагментов с *smz* генами из *Herbaspirillum huttiense* В601 осуществляли с помощью ПЦР с использованием праймеров, перечисленных в табл. 1. С помощью ПЦР-анализа с использованием праймеров pCB182f и pCB182r обнаруживали наличие рекомбинантных плазмид в клетках трансформантов при клонировании промоторных участков *smz* генов из *Herbaspirillum huttiense* В601 в вектор pCB182.

Реакционная смесь (30 мкл) содержала 3 мкл 10X буфера (Диалат Ltd., Россия), 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, по 60 пкмоль каждого из пары праймеров, 1 единицу BioTaq-полимеразы (Диалат Ltd., Россия), 100 нг общей ДНК или 1 мкл лизата клеток в качестве матрицы.

ПЦР проводили в термоциклере MJ Mini™ (Bio-Rad) по схеме: первоначальное инкубирование реакционной смеси при 95 °С в течение 4 мин; затем 30 циклов, состоящих из инкубаций: 95 °С – 30 с, отжиг при оптимальной температуре для праймеров – 30 с, 72 °С – 2 мин; и завершающее инкубирование смеси при 72 °С в течение 10 мин. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле.

Генетическое типирование бактерий осуществляли с помощью ERIC-ПЦР, придерживаясь ранее изложенной нами методики [13].

Плазмидную ДНК из бактерий *E. coli* выделяли методом щелочного лизиса [14]. Рестриктию плазмидной ДНК, довшивание Т-концов, обработку полимеразой Т4, фосфатазой и последующее лигирование фрагментов осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем ферментов MBI Fermentas (Литва). Трансформацию бактерий *E. coli* проводили согласно рекомендациям, приведенным в руководстве J. Sambrook et al. [15].

Трехродительские скрещивания проводили на твердой среде ТУ в соответствии с ранее приведенной методикой [16]. Для отбора трансконъюгантов полученную суспензию и

ее последовательные разведения высевали на селективную среду Г с добавлением канамицина (Km) – 30 мкг/мл.

Продукт трансформации симазина бактериальными культурами определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС). Непосредственно ВЭЖХ-МС анализ выполняли сотрудники НИЛ физико-химических методов исследований Белорусского государственного технологического университета. Подготовка проб для ВЭЖХ-МС анализа проводилась нами. Питательную жидкую TY среду объемом 0,3 мл с концентрацией симазина 1 г/л инокулировали свежей тестируемой суточной культурой в соотношении 1:100 и инкубировали в термостате при 28 °С в течение 5 дней. После окончания инкубирования культур высушивали культуральную жидкость с клетками досуха. Сухой остаток подвергали экстракции этиловым спиртом объемом 2 мл в течении ночи. После спиртовой экстракции образцы центрифугировали 10 мин при 8000 об/

мин и отбирали по 1 мл супернатанта в новую пробирку. Спиртовой экстракт высушивали досуха и отдавали на ВЭЖХ-МС анализ.

Для исследования дехлорирования симазина бактериальными штаммами ночные культуры бактерий инокулировали в соотношении 1:100 в свежие жидкие среды и инкубировали в течение 7 дней при 28 °С. Пробы культуральной жидкости объемом 20 мл отбирали через каждые сутки с соблюдением правил асептики. Перед проведением измерения клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 8000 об/мин в течение 5 мин. Затем проводили измерения величины электродвижущей силы (ЭДС) культуральной жидкости на иономере ЭВ-74, оснащенный хлорселективным электродом. Для построения калибровочного графика готовили стандартные растворы KCl с концентрациями в моль/кг H₂O: 3·10⁻⁴, 5·10⁻⁴, 1·10⁻³, 1·10⁻², 1·10⁻¹, 1,0. График зависимости значений потенциометра от концентрации Cl-ионов был линейным во всем интервале концентраций.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы изучали промоторную активность вышележащих участков генов *smzA* и *smzB* из бактерии *Herbaspirillum huttiense* V601 в клетках *E. coli*. С этой целью получили серию генетических конструкций на основе вектора pCB182, где вышележащие фрагменты открытых рамок считывания генов *smzA* и *smzB* были клонированы по сайту *Sma*I перед репортерным геном *lacZ*. Для этого амплификаты, полученные с использованием праймеров ProAf и ProAr (240 п.о.), ProBf₁ и ProBr (398 п.о.) и геномной ДНК штамма *H. huttiense* V601, лигировали с линейризованным рестриктазой *Sma*I вектором pCB182, к которому с помощью Taq-полимеразы были доведены тиминные концы. С помощью сине-белого теста в клетках *E. coli* DH5α была продемонстрирована промоторная активность только для вышележащего фрагмента открытой рамки считывания гена *smzA* штамма *H. huttiense* V601, но не для соответствующего участка гена *smzB*. Скорее всего, именно особенности функционирования регуляторной области гена *smzB* затруднили его экспрессию в неродственных штамму *H. huttiense* V601 бактериях и привели к невозможности утилизировать симазин при конъюгационном переносе.

На втором этапе работы выясняли влияние промоторных областей на экспрессию *smzA* гена в неродственных бактериях путем исследования активности считывания данного гена с индуцибельного промотора лактозного оперона P_{lac} и с собственного промотора в клетках *E. coli*. С этой целью была получена серия генетических конструкций на основе вектора pBluescript II KS(+), где полноразмерный ген *smzA* штамма *H. huttiense* V601 в клетках *E. coli* DH5α считывался с собственного промотора либо с индуцибельного промотора лактозного оперона P_{lac}. Для этого амплификаты, полученные с использованием праймеров ProAf и atzAfull-r (1665 п.о.) или atzAfull-f и atzAfull-r (1425 п.о.) и геномной ДНК штамма *H. huttiense* V601, лигировали с линейризованным рестриктазой *Eco*RV вектором pBluescript II KS(+), к которому с помощью Taq-полимеразы были доведены тиминные концы. Полученные рекомбинантные плазмиды были обозначены как pBI-Afull-F (вставка полноразмерной открытой рамки считывания гена *smzA* штамма *H. huttiense* V601 в прямой ориентации к промотору лактозного оперона P_{lac}), pBI-Afull-R (вставка полноразмерной открытой рамки считывания гена *smzA* штамма *H. huttiense* V601 в обратной

ориентации к промотору лактозного оперона P_{lac} , pBI-ProAfull-F (вставка полноразмерного гена *smzA* с собственным промотором штамма *H. huttiense* B601 в прямой ориентации к промотору лактозного оперона P_{lac}) и pBI-ProAfull-R (вставка полноразмерного гена *smzA* с собственным промотором штамма *H. huttiense* B601 в обратной ориентации к промотору лактозного оперона P_{lac}). Клоны, несущие рекомбинантные плазмиды, были реплицированы на TY среды с симaziном (2 г/л) с отсутствием или добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида

(ИПТГ) для индукции экспрессии трансгена с промотора P_{lac} и ее визуализации (рис. 1). Проявление Smz^+ фенотипа у трансформантов *E. coli* DH5 α , несущих гибридные плазмиды pBI-Afull-F, pBI-ProAfull-F и pBI-ProAfull-R, наблюдали на 4–5 день инкубации. Особенностью фенотипического проявления активности гена *smzA* было просветление среды с образованием непрозрачной зоны под Smz^+ колониями за счет накопления гидроксисимазина, образуемого в ходе реакции гидролитического дехлорирования симазина (рис. 1).

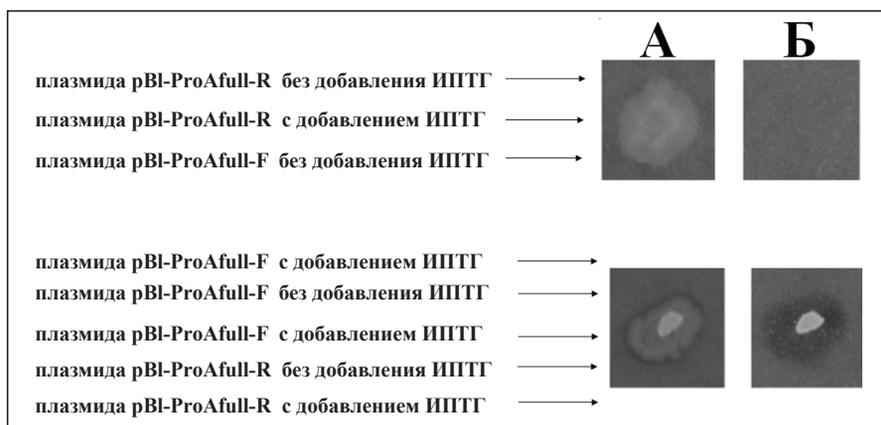


Рис. 1. Экспрессия гена *smzA* из *Herbaspirillum huttiense* B601 с различных промоторов в клетках *E. coli*: а – реплики клонов трансформантов *E. coli* DH5 α , несущих гибридные плазмиды на основе вектора pBluescript II KS(+), пятый день инкубации; б – те же реплики клонов трансформантов *E. coli* DH5 α , что и в столбце а, но с удаленной биомассой бактерий

Как и ожидалось, экспрессия гена *smzA* с собственного промотора в клетках *E. coli* DH5 α наблюдалась независимо от наличия или отсутствия ИПТГ в среде и ориентации клонированной последовательности по отношению к промотору P_{lac} (рис. 1).

В результате исследования хлорогидролазной активности показано, что конститутивная экспрессия гена *smzA* с собственного промотора в клетках *E. coli* DH5 α идет на уровне не ниже такового, обеспечивающегося промотором P_{lac} после его индукции ИПТГ (табл. 2).

Таблица 2

Динамика дехлорирования симазина

Вариант		День			
		0	3	5	7
Среда без инокуляции	Высвобождение ионов Cl^- , ммоль/л	0	0	0	0
	% трансформации симазина	0	0	0	0
<i>Herbaspirillum huttiense</i> B601	Высвобождение ионов Cl^- , ммоль/л	0	1,58 \pm 0,05	2,22 \pm 0,05	2,36 \pm 0,05
	% трансформации симазина	0	31,9 \pm 1	44,8 \pm 1	47,7 \pm 1
<i>E. coli</i> pBluescript II KS+	Высвобождение ионов Cl^- , ммоль/л	0	0	0	0
	% трансформации симазина	0	0	0	0
<i>E. coli</i> pBI-Afull-F (с добавлением ИПТГ)	Высвобождение ионов Cl^- , ммоль/л	0	1,16 \pm 0,05	1,16 \pm 0,05	1,16 \pm 0,05
	% трансформации симазина	0	23,4 \pm 1	23,4 \pm 1	23,4 \pm 1

Продолжение табл. 1

Вариант		День			
		0	3	5	7
<i>E. coli</i> pBI-ProAfull-F (без добавления ИПТГ)	Высвобождение ионов Cl ⁻ , ммоль/л	0	1,82±0,05	2,22±0,05	2,22±0,05
	% трансформации симазина	0	36,8±1	44,8±1	44,8±1
<i>E. coli</i> pUT-Km1	Высвобождение ионов Cl ⁻ , ммоль/л	0	0	0	0
	% трансформации симазина	0	0	0	0
<i>E. coli</i> pUT-smzA	Высвобождение ионов Cl ⁻ , ммоль/л	0	2,22±0,05	2,51±0,05	2,51±0,05
	% трансформации симазина	0	44,8±1	50,7±1	50,7±1
<i>Herbaspirillum frisingense</i> B416	Высвобождение ионов Cl ⁻ , ммоль/л	0	0	0	0
	% трансформации симазина	0	0	0	0
<i>Herbaspirillum frisingense</i> B416-smzA	Высвобождение ионов Cl ⁻ , ммоль/л	0	2,08±0,05	2,08±0,05	2,22±0,05
	% трансформации симазина	0	42±1	42±1	44,8±1
<i>Burkholderia</i> sp. 418	Высвобождение ионов Cl ⁻ , ммоль/л	0	0	0	0
	% трансформации симазина	0	0	0	0
<i>Burkholderia</i> sp.418-smzA	Высвобождение ионов Cl ⁻ , ммоль/л	0	1,26±0,05	2,36±0,05	2,51±0,05
	% трансформации симазина	0	25,5±1	47,7±1	50,7±1

Для переноса в биотехнологически ценные штаммы *Burkholderia* sp. 418 и *Herbaspirillum frisingense* B416 способности трансформировать симазин была сконструирована самоэлиминирующаяся плаزمида pUT-smzA, где ген *smzA* из *H. huttiense* B601, находящийся под контролем собственного промотора, был клонирован по сайту *NotI* вектора pUT-Km1 в состав транспозона Tn5. Перенос гена хлорогидролазы симазина в штаммы *Burkholderia* sp. 418 и *Herbaspirillum*

frisingense B416 осуществляли методом трехродительских скрещиваний, используя в качестве «помощника» штамм *E. coli* C600, несущий плазмиду pRK600. Культуры Km^r транскоњуогантов *Burkholderia* sp. 418 и *Herbaspirillum frisingense* B416 были реплицированы на поверхность TY агара с симазин (2 г/л). Под всеми реплицированными клонами транскоњуогантов обнаруживали зоны просветления среды в результате трансформации симазина (рис. 2).

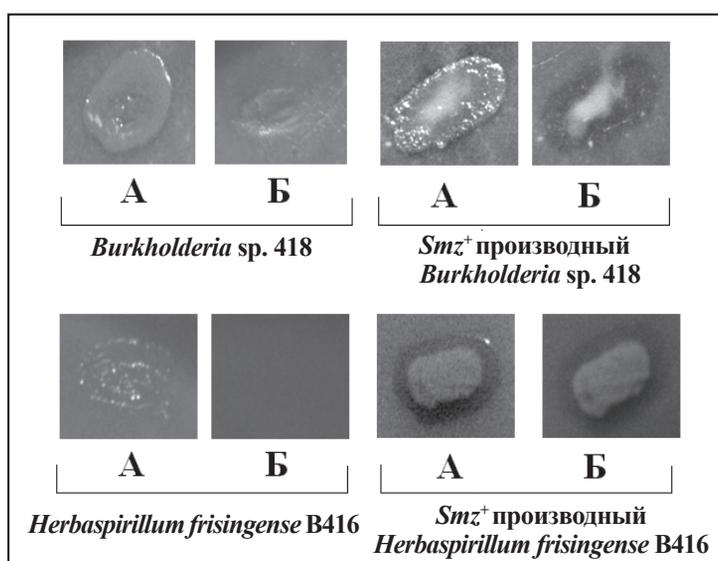


Рис. 2. Экспрессия гена *smzA* из *Herbaspirillum huttiense* B601 в клетках Smz⁺ производных *Burkholderia* sp. 418 и *Herbaspirillum frisingense* B416: а – реплики клонов на агаризованной среде TY с симазин, пятый день инкубации; б – те же реплики клонов, что и в столбце а, но с удаленной биомассой бактерий

Для подтверждения наличия в геноме Smz^+ трансконъюгантов *Burkholderia* sp. 418 и *Herbaspirillum frisingense* B416 гена симазинхлор-

гидролазы (*smzA*) из *Herbaspirillum huttiense* B601 использовали геноспецифичную ПЦР с праймерами ProAf и atzAfull-r. (рис. 3а).

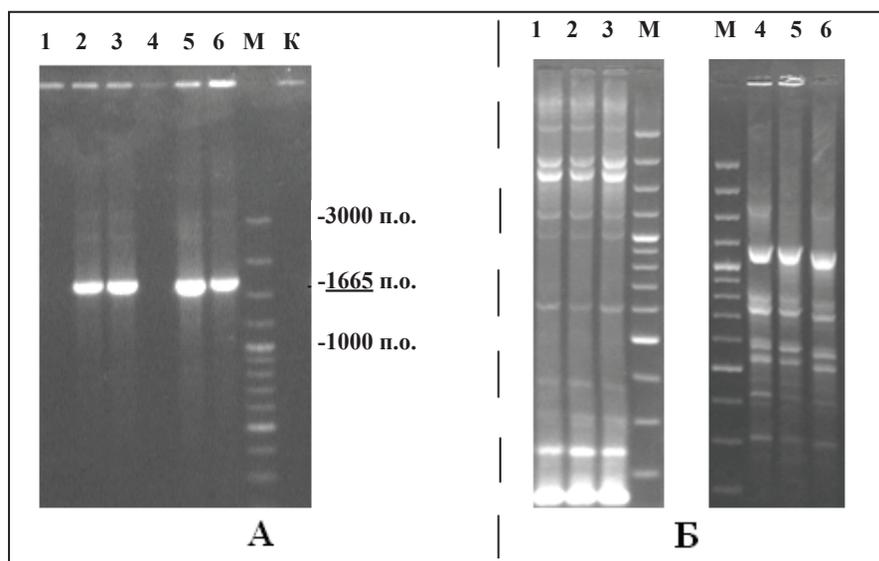


Рис. 3. ПЦР-анализ Smz^+ производных *Burkholderia* sp. 418 и *Herbaspirillum frisingense* B416: а – электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами ProAf и atzAfull-r; б – генотипирование с помощью Rep-ПЦР с использованием праймера ERIC2.

Дорожки: 1 – штамм *Burkholderia* sp. 418; 2–3 – Smz^+ производные *Burkholderia* sp. 418; 4 – штамм *Herbaspirillum frisingense* B416; 5–6 – Smz^+ производные *Herbaspirillum frisingense* B416; М – маркер молекулярной массы Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas); К – контроль без добавления матрицы

Для всех протестированных Smz^+ клонов было характерно появление на электрофореграмме специфического фрагмента длиной 1665 п.о., что свидетельствовало о присутствии целевого трансгена в геноме Smz^+ трансконъюгантов *Burkholderia* sp. 418 и *Herbaspirillum frisingense* B416 (рис. 3а). Генотипирование с помощью праймера ERIC2 Smz^+ трансконъюгантов *Burkholderia* sp. 418 и *Herbaspirillum frisingense* B416 подтвердило соответствующую родовую принадлежность отобранных Smz^+ клонов (рис. 3б). Полученные Smz^+ производные штаммов *Burkholderia* sp. 418 и *Herbaspirillum frisingense* B416 были обозначены как *Burkholderia* sp. 418-*smzA* и *Herbaspirillum frisingense* B416-*smzA*, соответственно.

При росте культур *Burkholderia* sp. 418-*smzA* и *Herbaspirillum frisingense* B416-*smzA* в ТУ среде без селективного давления (отсутствовал симазин и канамицин) сохранялась 100% наследуемость способности к трансформации симазина и через 20 пассажей.

С помощью хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) подтвердили образование ги-

дроксисимазина при трансформации симазина рекомбинантными штаммами *Burkholderia* sp. 418-*smzA* и *Herbaspirillum frisingense* B416-*smzA* (рис. 4).

В результате исследования хлорогидролазной активности показано, что рекомбинантные штаммы *Burkholderia* sp. 418-*smzA* и *Herbaspirillum frisingense* B416-*smzA*, как и бактерия *Herbaspirillum huttiense* B601, трансформируют до 50% содержащегося в среде симазина в течение 5 суток (табл. 2).

Известно, что штаммы *Herbaspirillum frisingense* B416 и *Burkholderia* sp. 418 обладают способностью к конкурентному заселению корней различных сельскохозяйственных культур, низкотемпературной фиксации молекулярного азота и стимуляции роста растений. Перенос гена *smzA* из *Herbaspirillum huttiense* B601 в штаммы *Burkholderia* sp. 418 и *Herbaspirillum frisingense* B416 определяет у них новое свойство – способность трансформировать симазин в менее токсичный продукт, что позволяет использовать данные штаммы для биоремедиации загрязненных симм-триазидами почв.

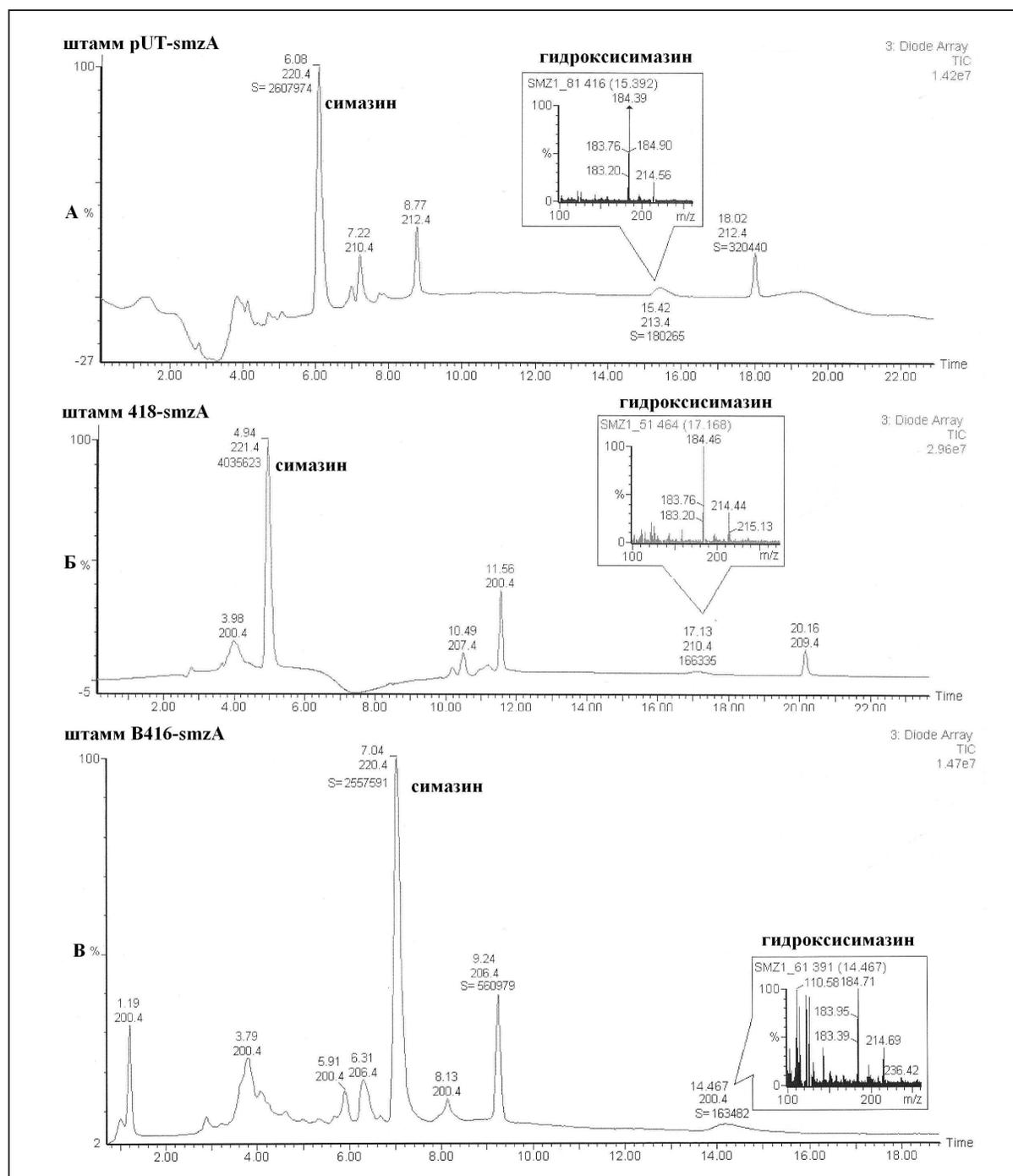


Рис. 4. Хроматограммы экстрактов культуральной среды после 5 дней инкубации штаммов: а – *E. coli* pUT-smzA; б – *Burkholderia* sp. 418-smzA; в – *Herbaspirillum frisingense* B416-smzA

Заключение

Таким образом, исследована экспрессия генов катаболизма симазина бактерии *Herbaspirillum huttiense* B601 в клетках *E. coli*. Продемонстрирована конститутивная экспрессия гена симазинхлоргидролазы с собственного промотора в клетках гетерологичных хозяев. На основе хозяйственно-ценных бактерий скон-

струированы *in vitro* рекомбинантные штаммы-деструкторы симазина *Burkholderia* sp. 418-smzA и *Herbaspirillum frisingense* B416-smzA. Придание указанным штаммам способности дехлорировать симазин расширяет спектр их полезных качеств, что дает возможность применять их и на загрязненных симм-триазинами почвах.

Список использованных источников

1. Коляда, Т.И. Токсическое последствие симазина и атразина на сельскохозяйственные культуры / Т.И. Коляда, Н.И. Туренков, И.А. Добровольская // Почвоведение и агрохимия: сб. науч. трудов. – Вып. 25. – Минск: Ураджай, 1989. – С. 122–127.
2. Field-scale remediation of atrazine contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase / L.S. Strong [et al.] // Environ. Microbiol. – 1999. – № 2 – P. 91–98.
3. Бажанов, Д.П. Плазмидная локализация генов деградации хлорированных симметризинов / Д.П. Бажанов, К.И. Забенькова // Тез. межд. симп. «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология» (18–21 ноября 2001 г., г. Москва; 22–24 ноября 2001 г., г. Минск). – Минск, 2001. – С. 11–13.
4. De Souza, M.L. The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP / M.L. de Souza, L.P. Wackett, M.J. Sadowsky // Appl. Environm. Microbiol. – 1998. – V. 64. – P. 2323–2326.
5. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved / M.L. de Souza [et al.] // J. Bacteriol. – 1998. – V. 180. – P. 1951–1954.
6. Бажанов, Д.П. Плазмиды ризосферной бактерии В601, утилизирующей симазин / Д.П. Бажанов, К.И. Забенькова // Генетика и селекция в XXI веке: мат. VIII съезда генетиков и селекционеров Республики Беларусь. Минск, 23–25 июля 2002 г. – Минск, 2002. – С. 239.
7. Бажанов, Д.П. Мобилизация генов деградации симазина плазмидой рSa / Д.П. Бажанов, К.К. Яцевич // Цитология и генетика. – 2007, № 1. – С. 16–22.
8. Яцевич, К.К. Перенос способности утилизировать симазин в грамотрицательные бактерии при конъюгации. / К.К. Яцевич, Д.П. Бажанов // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: мат. межд. конф. (26–28 мая 2004 г., Минск) – г. Минск, 2004. – С. 176–177.
9. Яцевич, К.К. Сравнительная характеристика генов катаболизма симазина ризосферной бактерии *Herbaspirillum* sp. В601 / К.К. Яцевич, Д.Г. Ярмолинский, Д.П. Бажанов // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2006, № 5. – С. 238–244.
10. Schneider, K. Promotor-probe vectors for the analysis of divergently arranged promoters / K. Schneider, C.F. Beck // Gene. – 1986. – Vol. 42. – P. 37–48.
11. Alting-Mees, M.A. pBluescript II: gene mapping vectors / M.A. Alting-Mees, J.M. Short // Nucl. Acids Res. – 1989. – V. 17 – P. 9494.
12. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria / V. Lorenzo [et al.] // J. Bacteriol. – 1990. – V. 172. – P. 6568–6572.
13. Бажанов, Д.П. Филогенетическая идентификация трех штаммов ризосферных бактерий на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и генетического типирования / Д.П. Бажанов, К.К. Яцевич, А.А. Бажанова // Микробиология. 2010. – Т. 79. № 3. – С. 394–404.
14. Birnboim, H.L. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA / H.L. Birnboim, J. Doly // Nucl. Acids. Res. – 1979. – Vol. 7. – P. 1513–1523.
15. 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.
16. Бажанов, Д.П. Экспрессия гена *nifA* *Klebsiella pneumoniae* в diazотрофных ризобактериях / Д.П. Бажанов, Н.А. Троицкий // Генетика – 1992. – Т. 28, № 10. – С. 40–47.

Дата поступления статьи 26 июня 2013 г.

РЕФЕРАТЫ

SUMMARIES

УДК 577.21:575:616.71/.72-002.77

Повреждения ДНК и их репарация при ювенильном ревматоидном артрите и в контрольных группах детей / Н.В. Никитченко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 7–15. – Соавт.: Е.В. Сечко, В.В. Хомич, А.М. Чичко, Р.И. Гончарова, А.В. Сукало, Н.И. Рябоконт.

С использованием теста ДНК-комет проведено исследование состояния генома и эксцизионной системы репарации оснований ДНК в лимфоцитах периферической крови контрольных групп детей (негативный и позитивный контроль) и пациентов с ювенильным ревматоидным артритом (ЮРА) различных подтипов (юношеский полиартрит и олигоартрит, юношеский артрит с системным началом). Общее количество исследуемых доноров – 179. Впервые для детской популяции Беларуси изучены уровни спонтанных и индуцированных (при воздействии окислительном стрессом *in vitro*) повреждений ДНК. Описаны кинетика, эффективность и скорость репарации в лимфоцитах периферической крови детей в норме и при патологии (воспалительных и аутоиммунных реакциях). Установлено, что у пациентов с диагнозом ЮРА наблюдаются повышенные уровни спонтанных и индуцированных повреждений ДНК, а также пониженная скорость репарации ДНК, свидетельствующие о неблагоприятном состоянии генома при ЮРА. Полученные данные обсуждаются с позиций нестабильности генома.

Ключевые слова: ювенильный ревматоидный артрит, лимфоциты периферической крови, метод ДНК-комет, повреждения ДНК, репарация ДНК.

DNA damages and their repair at juvenile rheumatoid arthritis and in control groups of children / N. Nikitchenko [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 7–15. – E. Sechko, V. Chomich, A. Chichko, R. Goncharova, A. Sukalo, N. Ryabokon.

Study on genome state and DNA base excision repair has been carried out in lymphocytes of peripheral blood of control groups of children (negative and positive controls) and patients with juvenile rheumatoid arthritis (JRA) of different subtypes (juvenile polyarthritis and oligoarthritis, juvenile systemic arthritis) using comet assay. A total number of studied donors is 179. The levels of spontaneous and induced (by oxidized stress *in vitro*) DNA damages has been studied for children population of Belarus for the first time. The kinetics, efficiency and rate of DNA repair in peripheral blood lymphocytes in normal and pathological (at inflammatory and autoimmune reactions) conditions have been described. Increased levels of spontaneous and induced levels of DNA damage, as well decreased rate of DNA repair has been found in patients with JRA, testifying unfavorable genome state at JRA. Received data are discussed with genome instability point of view.

Key words: juvenile rheumatoid arthritis, peripheral blood lymphocytes, comet assay, DNA damage, DNA repair.

УДК 575.174.015.3:616.127-007.61

Влияние полиморфизма генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы на выраженность клинических признаков гипертрофической кардиомиопатии / С.С. Ниязова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 16–23. – Соавт.: Н.Н. Чакова, Е.П. Михаленко, Э.В. Крупнова, Н.В. Чеботарева, С.М. Комиссарова.

Проведено исследование полиморфизма генов, кодирующих белки ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, и клинических признаков гипертрофической кардиомиопатии у пациентов с данной патологией. Обнаружено влияние I/D-полиморфизма гена *ACE*, -1903A>G полиморфизма гена *СМА1* и 1166A>C полиморфизма гена *AGTR1* на выраженность гипертрофии миокарда левого желудочка, выявлена ассоциация II генотипа гена *ACE* и CT генотипа гена *СYP11B2* с большей степенью выраженности ишемических изменений, а также DD генотипа гена *ACE* с увеличением дисперсии скорректированного интервала QTcd.

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия, ренин-ангиотензин-альдостероновая система, полиморфизм генов *ACE*, *СМА1*, *AGTR1* и *СYP11B2*.

Impact of genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system on the expression of clinical signs of hypertrophic cardiomyopathy / S. Niyazova [et al.] // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 16–23. – N. Chakova, E. Michalenko, E. Krupnova, N. Chebotareva, S. Komissarova.

Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system and clinical signs of hypertrophic cardiomyopathy in patients with this pathology were investigated. The influence of *ACE* gene *I/D*-polymorphism, *CMAI* gene *-1903A>G* polymorphism and *AGTR1* gene *1166A>C* polymorphism on the severity of left ventricular hypertrophy was found, association *II* genotype of *ACE* gene and *CT* genotype of *CYP11B2* gene with a greater severity of ischemic changes, and association *DD* genotype of *ACE* gene with increased QT dispersion was identified.

Key words: hypertrophic cardiomyopathy, the renin-angiotensin-aldosterone system, *ACE*, *CMAI*, *AGTR1* and *CYP11B2* gene polymorphisms.

УДК 616.1:616.4

Генетические факторы риска развития метаболического синдрома / М.Д. Амелянович [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 24–31. – Соавт.: П.М. Морозик, А.Л. Гончар, И.Б. Моссэ.

Метаболический синдром (МС) сегодня находится в центре внимания многих исследовательских лабораторий по всему миру. Стремительное увеличение распространенности МС в различных возрастных группах обуславливает необходимость определения генетических механизмов его развития с целью поиска эффективных современных подходов к профилактике и лечению данного заболевания. В настоящей работе была проведена оценка ассоциации полиморфизмов генов *ACE*, *TCF7L2*, *PPARG*, *UCP2*, 2-го и 5-го факторов свертываемости крови с риском развития метаболического синдрома. По результатам генотипирования статистически достоверная взаимосвязь с риском развития данного заболевания была показана для полиморфизмов *I/D* гена *ACE* ($\chi^2 = 4,49$, $P < 0,05$), *C/T* гена *TCF7L2* ($\chi^2 = 8,10$, $P < 0,01$) и *Ala/Val* гена *UCP2* ($\chi^2 = 6,48$, $P < 0,05$). Выявление генетических факторов риска МС имеет большое социально-экономическое значение, т.к. позволит проводить профилактику этого заболевания, а также избежать развития многих опасных осложнений посредством выбора корректных методов лечения.

Ключевые слова: метаболический синдром, генетическая предрасположенность, профилактика.

Genetic risk factors for developing metabolic syndrome / M. Ameliyanovich [et al.] // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 24–31. – P. Marozik, A. Gonchar, I. Mosse.

Metabolic syndrome (MetS) today is in the spotlight of various investigating laboratories all over the world. The rapid increase of MetS frequency in populations of all ages determines the necessity of revealing genetic mechanisms of its development in order to find effective and modern approaches for prevention and therapy of this disease. In present study, association of *ACE*, *TCF7L2*, *PPARG*, *UCP2*, 2nd and 5th blood coagulation factors genes with MetS risk development has been evaluated. By gene analysis, a statistically significant association with MetS development risk was shown for *I/D* polymorphism of *ACE* gene ($\chi^2 = 4,49$, $P < 0,05$), *C/T* polymorphism *TCF7L2* of gene ($\chi^2 = 8,10$, $P < 0,01$) and *Ala/Val* polymorphism of *UCP2* gene ($\chi^2 = 6,48$, $P < 0,05$). Evaluation of xnjMetS risk factors has a great social and economic importance, as it will help to carry out early preventive procedures and avoid multiple dangerous complications through selection of correct methods of its therapy.

Key words: metabolic syndrome, genetic predisposition, prevention.

УДК 577.21:796

Молекулярно-генетический анализ гена *HIF1A* для оценки физической работоспособности спортсмена / К.В. Жур [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 32–38. – Соавт.: Л.А. Кундас, Н.И. Бышневу, Е.А. Лосицкий, П.Н. Малашевич, И.Б. Моссэ.

Гипоксия – один из ключевых факторов, лимитирующих работоспособность спортсмена. Главным регулятором клеточного и системного гомеостатического ответа на недостаток кислорода является ген *HIF1A*. Цель работы – определить информативность анализа полиморфизма *C1772T* гена *HIF1A* для оценки физической работоспособности.

Проведено генотипирование 292 спортсменов и 268 человек контрольной группы методом ПЦР-РВ *TaqMan*. Для анализа экспрессии гена использован *ΔCq* метод относительного определения уровня представленности транскриптов.

Установлено, что сумма частот генотипов *CT+TT* гена *HIF1A* достоверно ниже у спортсменов видов спорта, требующих аэробного энергообеспечения, и значимо выше у представителей видов спорта с анаэробным лактатным энергообеспечением (4,0% и 16,5% соответственно, против 10,8% в контроле; $P \leq 0,05$). В группе мастеров спорта международного класса частота встречаемости генотипов *CT+TT* значимо выше, чем в группе мастеров спорта (13,6% и 4,1% соответственно; $P \leq 0,05$). Показаны значительные индивидуальные различия экспрессии гена *HIF1A* в покое и в ответ на физическую нагрузку. Следовательно, молекулярно-генетический анализ гена *HIF1A* можно рекомендовать в качестве критерия оценки физической работоспособности спортсмена.

Ключевые слова: ген *HIF1A*, ПЦР-анализ, ДНК-полиморфизмы, экспрессия гена, устойчивость к гипоксии.

Molecular genetic analysis of *HIF1A* gene to test athlete performance / K. Zhur [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 32–38. – L. Kundas, N. Byshnev, Y. Lasitski, P. Malashevich, I. Mosse.

We investigated whether single-nucleotide polymorphism *C1772T* in *HIF1A* gene is associated with athlete resistance to a physical stress.

The study was carried out on 292 athletes and 268 control subjects. *HIF1A C1772T* polymorphism was genotyped with the *TaqMan* system. We used $\Delta\Delta Cq$ method in order to calculate relative gene expression.

The sum of *HIF1A* gene *CT+TT* genotypes frequencies was significantly lower in athletes of sports that mostly require the aerobic energy and significantly higher in athletes of sports that mostly require anaerobic (lactate) energy (4,0% and 16,5%, respectively, compared to 10,8% in control; $P \leq 0,05$). Frequency of *CT+TT* genotypes was statistically significantly higher for international champions group compared to national champions group (13,6% and 4,1%, respectively; $P \leq 0,05$). It was established individual variation in *HIF1A* gene expression during rest and exercises. We conclude that functional polymorphism of *HIF1A* gene can be used in the diagnostic system for hypoxia resistance evaluation.

Key words: *HIF1A*, PCR analysis, DNA polymorphisms, gene expression, resistance to hypoxia.

УДК 575.174.015.3

Панкратов, В.С. Структура генофондов населения двух регионов Белорусского Полесья по маркерам *Y*-хромосомы и митохондриальной ДНК / В.С. Панкратов, О.Г. Давыденко // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 39–47.

Население Белорусского Полесья характеризуется рядом уникальных лингвистических и антропологических черт, отличающих его от жителей других регионов Беларуси. Более того, по указанным признакам жители разных регионов Белорусского Полесья различаются также и между собой. Относительно причин такой самобытности и гетерогенности жителей Полесья существует множество мнений, однако данных для однозначного подтверждения какого-либо из них недостаточно. Проведенное исследование структуры генофондов населения двух регионов Белорусского Полесья по маркерам *Y*-хромосомы и митохондриальной ДНК (мтДНК) выявило сходство населения выбранных популяций с общей популяцией белорусов по маркерам мтДНК, но различия по маркерам *Y*-хромосомы, причем каждая из популяций характеризуется своими особенностями генетического пула *Y*-хромосомы. Наиболее вероятным объяснением этих различий представляется дрейф в результате «эффекта основателя» по мужской линии с последующей изоляцией.

Ключевые слова: *Y*-хромосома, митохондриальная ДНК, Белорусское Полесье.

Pankratov, S. Gene pools structure of the population of two regions of Byelorussian Polesie based on *Y*-chromosome and mitochondrial DNA markers / V. Pankratov, O. Davydenko // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 39–47.

The population of Byelorussian Polesie is characterized by a number of unique linguistic and anthropological traits that distinguish it from inhabitants of other parts of Belarus. Indeed local populations of different regions of Byelorussian Polesie differ from each other in the traits mentioned above. There are several hypotheses proposed to explain such uniqueness and heterogeneity of Polesie inhabitants, but there is no sufficient data to unambiguously prove any of them. The study of the gene pool structure of populations of two regions of Byelorussian Polesie based on *Y*-chromosome and mitochondrial DNA (mtDNA) revealed similarity between mtDNA gene pools of the populations in question and the overall Byelorussian population but differences in the case of *Y*-chromosome markers. Moreover, *Y*-chromosome gene pools of the two populations were also differed from each other. The most likely explanation of these differences is drift as a result of paternal founder effect followed by isolation.

Key words: *Y*-chromosome, mitochondrial DNA, Byelorussian Polesie.

УДК 633.854.54:631.526.32

Обоснование оптимальных параметров модели сорта льна масличного для условий Республики Беларусь / С.И. Вакула [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 48–54. – Соавт.: В.Н. Леонтьев, В.Г. Лугин, В.В. Титок, А.В. Кильчевский.

На основании многолетнего изучения коллекции льна масличного ИГЦ НАН Беларуси и литературных данных по мировым коллекциям льна в ВИР (Россия) и PGRC (Канада) нами разработаны параметры оптимальной модели сорта льна масличного для условий центральной агроклиматической зоны Республики Беларусь. Разработанная модель сорта учитывает изменчивость и взаимосвязь 18 основных хозяйственно ценных признаков продуктивности и биохимического состава семян.

Ключевые слова: лен масличный, модель сорта, условия выращивания, биохимический состав, продуктивность.

Objectivation for optimal model parameters of flaxseed cultivar for conditions of Belarus / S. Vakula [et.al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 48–54. – V. Leontiev, V. Lugin, V. Titok, A. Kilcheuski.

Based on our perennial observations (flaxseed germplasm collection of the IGC at the National Academy of Sciences of Belarus) and published data on the flaxseeds germplasm collections in VIR (Russia) and PGRC (Canada), we developed parameters of the ideal (model) flax cultivar. This cultivar will have a potential in of the conditions of the central zone of the Republic of Belarus. Our model took into account the variability and relation between 18 major traits of productivity and seeds biochemical composition.

Key words: flaxseed, pattern of the cultivar, growing conditions, biochemical composition, productivity.

УДК 634.11:631.524.86

Урбанович, О.Ю. ПЦР-основанное клонирование гомолога генов *HcrVf* из генома сорта груши Память Яковлева / О.Ю. Урбанович, П.В. Кузмицкая // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 55–60.

С помощью метода ПЦР-основанного клонирования из генома высокоустойчивого к парше сорта груши Память Яковлева была выделена последовательность *PVf1* длиной в 3081 п.о. В последовательности *PVf1* была обнаружена полноразмерная рамка считывания длиной в 3036 п.о., кодирующая последовательность гипотетического белка длиной в 1012 аминокислотных остатков. Анализ последовательности показал, что она гомологична последовательностям кластера генов яблони *HcrVf*. Сравнение аминокислотных последовательностей гипотетического белка и белка, кодируемого функционально активным геном *HcrVf2*, показало, что обе последовательности имеют одинаковые консервативные домены. Последовательность *PVf1* может служить кандидатом на роль гена устойчивости к парше в геноме груши.

Ключевые слова: парша груши, гены *HcrVf*, гены устойчивости растений, анализ нуклеотидной последовательности, консервативные домены.

Urbanovich, O. PCR-based full-length cloning of *HcrVf* homolog from pear cv. ‘Pamyat Yakovleva’ / O. Urbanovich, P. Kuzmitskaya // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 14. – Minsk, 2013. – P. 55–60.

Using the method of PCR-based cloning candidate scab resistance gene was isolated from high-resistance to scab pear cv. ‘Pamyat Yakovleva’. This nucleotide sequence was named *PVf1*. The length of *PVf1* was 3081 bp, including a complete open reading frame of 3036 bp encoding hypothetical protein of 1012 amino acids. Sequence analysis indicated that it is homologous to the apple gene cluster *HcrVf*. Comparison of amino acid sequences of hypothetical protein and protein coding by functionally active *HcrVf2* gene showed that both sequences have the same conserved domains.

Key words: pear scab, genes *HcrVf*, plant resistance genes, analysis of nucleotide sequence, conserved domains.

УДК 633.63:577.213*311.347:575.117.2

Анализ вариантов митохондриальных генов *atpA* и *atp6* у линий и гибридов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), возделываемых в Беларуси / А.М. Свирщевская [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 61–71. – Соавт.: О.М. Малышева, Л.В. Милько, О.Ч. Мазур, С.А. Мелентьева, И.С. Татур, А.В. Кильчевский.

Были исследованы типы (нормальной N и Оуэновской стерильной S) цитоплазмы в 43-х популяциях сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), представляющих гибриды, мужскостерильные и фертильные линии различного проис-

хождения, включая гиногенетические, используемые в белорусской селекционной практике. Метод определения типов цитоплазмы по вариантам митохондриальных генов *atp6* и *atpA* был достаточно прост и надежен и позволил различать фертильные растения сахарной свеклы от стерильных на ранних этапах формирования свеклольного растения, что было важно для селекционных программ, а также способствовал разрешению спорных моментов при составлении молекулярно-генетических паспортов коммерческих гибридов сахарной свеклы, закупаемых хозяйствами Республики Беларусь из-за рубежа.

Ключевые слова: сахарная свекла, цитоплазматическая мужская стерильность, экспрессия митохондриальных генов.

Analysis of mitochondrial genes *atpA* and *atp6* variants in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines and hybrids grown in Belarus / A. Svirshchevskaya [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 61–71. – O. Malysheva, L. Milko, O. Mazur, S. Melentjeva, I. Tatur, A. Kilcheuski.

Cytoplasm types (normal N and sterile S of Owen type) in 43 sugar beet (*Beta vulgaris* L.) populations representing hybrids, cytoplasmic male sterile and fertile lines of different origin including gynogenetic lines from Belarusian breeding practise have been investigated. Cytoplasm type determination method based on two mitochondrial *atp6* and *atpA* genes variants assessment was simple and reliable enough to distinguish between fertile and sterile sugar beet plants at early stages of beet plant development. It was important for breeding programmes and it also helped in solving problems with molecular genetic passports composition for commercial sugar beet hybrids purchased for farms of Republic from abroad.

Key words: sugar beet, cytoplasmic male sterility, mitochondrial genes expression.

УДК 631.524.86:633.11:632.3

Волуевич, Е.А. Генетические подходы в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине / Е.А. Волуевич // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 16 – Минск, 2013. – С. 72–81.

Современная стратегия селекции пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине предусматривает координацию международных усилий как при проведении мониторинга генов вирулентности в популяциях этого гриба, выявлению эффективных генов и источников устойчивости, так и кооперацию в области селекции устойчивых сортов. В статье приводится информация о биологических особенностях возбудителя болезни, эффективности генов устойчивости к этому патогену и рассматриваются генетические подходы в создании устойчивых сортов. Они включают использование генов ювенильной и возрастной устойчивости и их пирамидирование.

Ключевые слова: мягкая пшеница, стеблевая ржавчина, гены устойчивости, стратегия селекции.

Voluevich, E. Genetic approaches in common wheat breeding for resistance to stem rust / E. Voluevich // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 72–81.

The current strategy of breeding wheat for resistance to stem rust involves coordinating international efforts both in the monitoring of virulence genes in populations of the fungus, the identification of effective genes, finding sources of resistance and cooperation in the field of breeding resistant varieties. The article provides information on the biology of the pathogen, the effectiveness of resistance genes to this pathogen and genetic approaches in the development of resistant varieties. These include the use of seedling and adult resistance genes and their pyramiding.

Key words: bread wheat, stem rust, resistance genes, the strategy selection.

УДК 575.222.73

Создание и оценка вторичного генофонда тритикале (*x Triticosecale* Wittm.) для использования в селекции на короткостебельность и устойчивость к предуборочному прорастанию / Н.И. Дубовец [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 82–90. – Соавт.: Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич, А.Ю. Носова.

С целью создания вторичного генофонда тритикале проведена гибридизация замещенных форм гексаплоидных пшенично-ржаных гибридов с современными сортами культуры. Из гибридных популяций F_4 в ходе кариотипирования выделено 8 стабильных рекомбинантных линий с различными типами D(A)- и D(B)-замещений хромосом. Проведены морфометрический анализ линейного материала и лабораторная оценка его устойчивости к предуборочному прорастанию, исследован аллельный состав генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht8*. По совокупности полученных данных выделены 2 перспективные для селекции рекомбинантные линии гексаплоидных тритикале.

Ключевые слова: тритикале, хромосомно-замещенные линии, короткостебельность, устойчивость к предуборочному прорастанию.

Development and assessment of secondary gene pool of triticale (*x Triticosecale* Wittm.) for use in breeding for semidwarfness and resistance to pre-harvest sprouting / N. Dubovets [et al.] // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings.* – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 82–90. – Y. Sycheva, L. Solovey, T. Shtyk, Y. Bondarevich, A. Nosova.

Hybridization of substituted forms of hexaploid wheat-rye hybrids was carried out with modern crop cultivars for developing the secondary gene pool of triticale. Eight stable recombinant lines with different types of D(A)- and D(B)-chromosome substitutions were selected out of hybrid populations F_4 during caryotyping. Morphometric analysis of the line material and laboratory assessment of its resistance to pre-harvesting sprouting were made, with allelic composition of *Rht-B1* and *Rht8* genes for semidwarfness being investigated. On the basis of the total data obtained, two recombinant lines of hexaploid triticale promising for breeding were selected.

Key words: triticale, chromosome-substitution lines, semidwarfness, resistance to the pre-harvest sprouting.

УДК 575.174.015.3:635.92:582.912

Оценка генетической гетерогенности растений *Calluna vulgaris* и *Arctostaphylos uva-ursi* (семейства *Ericaceae*), перспективных для создания декоративных посадок / С.В. Кубрак [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 91–96. – Соавт.: Н.Б. Павловский, Л.В. Кухарева, В.В. Титок, Л.В. Хотылева.

Представители семейства *Ericaceae* вереск обыкновенный (*Calluna vulgaris* (L) Hull.) и толокнянка обыкновенная (*Arctostaphylos uva-ursi* (L) Spreng.) используются в садовом дизайне как декоративные кустарники. Получение новых форм вереска и толокнянки методом индивидуального отбора из природных популяций дает возможность создавать генотипы с ценными декоративными признаками. Различия на уровне ДНК, выявленные ISSR-анализом и RAPD-анализом, позволили эффективно идентифицировать новые формы и продемонстрировать их отличие от исходных дикорастущих популяций. Наибольшее число полиморфных фрагментов у образцов толокнянки выявлено с помощью праймеров OPB 08, ISSR-17, ISSR-24. На растениях вереска высокую информативность проявили праймеры OPA F16, OPA C20, ISSR-10. Праймеры ISSR-4, ISSR-9 и OPW 19 оказались эффективны для выявления полиморфизма у обоих исследуемых видов. Полученные результаты подтверждают, что индивидуальный отбор по декоративным признакам позволил выделить из дикорастущих популяций генетически гетерогенные образцы, на основе которых будут созданы новые сорта.

Ключевые слова: полиморфизм, ISSR, RAPD, Вересковые.

Genetic heterogeneity of plants promising for landscape gardening – *Calluna vulgaris* and *Arctostaphylos uva-ursi* (family *Ericaceae*) / S.V. Kubrak [et al.] // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings.* – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 91–96.

Common heather (*Calluna vulgaris* (L) Hull.) and bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* (L) Spreng.), plants of a family *Ericaceae*, are used as ornamental shrubs in garden design. Single plant selection from natural populations allows development of new genotypes of heather and bearberry with valuable decorative characters. By ISSR and RAPD methods we identified DNA-level differences that's were effective for identify of new forms and had demonstrate distinctions from the original wild populations. Primers OPB 08, ISSR-17, ISSR-24 detected the largest number of polymorphic fragments in accessions of bearberry. On the heather plants high information showed primers OPA F16, OPA C20, ISSR-10. The primers ISSR-4, ISSR-9, OPW 19 were effective in detecting polymorphism in both species studied. The results confirm that it is possible to derive genetically heterogeneous accessions from wild populations using single plant selection based on the plants ornamental characters.

Key words: polymorphism, ISSR, RAPD, *Ericaceae*.

УДК 604.6+608.3

Ермишин, А.П. Особенности использования метода ПЦР в реальном времени для детекции и количественного определения генетически модифицированных составляющих в продуктах питания / А.П. Ермишин // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 97–103.

При количественном определении содержания генетически модифицированных составляющих (ГМС) в образцах референсных материалов трансгенной сои и кукурузы методом ПЦР в реальном времени выявлена суще-

ственная вариация показаний. Для вынесения обоснованного заключения по результатам испытаний необходимо определить с помощью методов статистики, достоверно ли (при $P = 0,05$) значение содержания ГМС в образце превышает допустимый порог 0,9%.

Метод ПЦР в реальном времени обладает более высокой чувствительностью по сравнению со стандартным методом ПЦР + электрофорез. Для того, чтобы избежать ложно положительных результатов, а также соотнести полученные этими методами результаты, предлагается считать положительными пробы, содержание ГМС в которых достоверно (при $P = 0,05$) превышает 0,1% (чувствительность метода ПЦР + электрофорез). В тех случаях, когда скрининговые исследования проводятся без количественной оценки ГМС, предлагается использовать в качестве положительного контроля соответствующие референсные материалы (сои или кукурузы), содержащие 0,1% ГМС. Положительными могут считаться пробы, dC_t которых достоверно (при $P = 0,05$) превышает dC_t такого положительного контроля.

Ключевые слова: детекция ГМО, маркировка ГМ-продуктов, 35S промотор, количественное определение ГМО.

Yermishin, A. Peculiarities of using real time PCR method for detection and quantification of genetically modified components in food / A. Yermishin // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings.* – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 97–103.

Considerable data variation has been revealed in study on GMO quantification in reference materials of transgenic soya and maize by the method of real time PCR. Hence, for reasoned decision-making it is necessary to determine by statistic methods whether GMO content in sample exceeds essentially ($P = 0,05$) permissible threshold of 0,9%.

The method of real time PCR has higher sensitivity in comparison with standard method of PCR + electrophoresis. To avoid false positive results and to correspond the results obtained by means of these two methods it is proposed to consider as positive those samples GMO content in that essentially ($P = 0,05$) exceeds 0,1% (sensitivity of the method of PCR + electrophoresis). In case when screening study by the method of real time PCR does not include GMO quantification it is proposed to use as positive control of corresponding reference materials (soya or maize), containing 0,1% GMO. Samples may be considered as positive if their dC_t essentially ($P = 0,05$) exceeds dC_t of such positive control.

Key words: GMO detection, GMO labeling, CaMV35S promoter, GMO quantification.

УДК 635.64:631.527:577.21

Использование ДНК-маркеров для изучения генетической изменчивости родительских форм гибридов томата (*Solanum lycopersicum*) и особенностей проявления гетерозиса / О.Г. Бабак [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 104–112. – Соавт.: Н.А. Некрашевич, А.М. Добродькин, И.Г. Пугачева, М.М. Добродькин, А.В. Кильчевский.

Проведено изучение генетической гетерогенности родительских образцов томата методами ISSR и SSR-анализа. На основании результатов анализа созданы гибриды с различной генетической дистанцией между родителями. Изучены особенности проявления истинного и гипотетического гетерозиса по биометрическим признакам у гибридов томата. При разделении изучаемых родительских генотипов на два кластера по генетической дивергенции выявлена тенденция к более высоким эффектам гетерозиса по признакам урожайности при гибридизации генотипов, принадлежащих к разным кластерам в сравнении с гибридизацией внутри кластеров. Установлена невозможность отбора высокопродуктивных гетерозисных гибридов на основе значений генетической дистанции между родительскими формами, рассчитанной на основе ISSR- и SSR-анализа.

Ключевые слова: томат, ISSR- и SSR-анализ, проявление гетерозиса.

Use of DNA markers for studying genetic variability of parental forms in tomato hybrids (*Solanum lycopersicum*) and heterosis manifestation features / O. Babak [et al.] // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings.* – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 104–112. – N. Nekrashevich, A. Dobrodkin, I. Pugachova, M. Dobrodkin, A. Kilcheuski.

Genetic heterogeneity of tomato parental accessions was studied by ISSR- and SSR-analysis methods. Based on the results of the analysis, hybrids with a different genetic distance between parents were developed. Manifestation features of true and hypothetical heterosis were investigated by biometric traits in tomato hybrids. When dividing parental genotypes under study into two genetic divergence clusters the tendency to higher heterosis effect was revealed for productivity traits by hybridization of genotypes attributed to other clusters as compared to intracluster

hybridization. Impossibility of highly productive heterotic hybrids selection in terms of genetic distance between parental forms calculated by ISSR- and SSR-analysis methods was revealed.

Key words: tomato, ISSR and SSR-analysis, heterosis manifestation.

УДК 577.21:579.84

Яцевич, К.К. Конструирование *in vitro* рекомбинантных штаммов-деструкторов симазина / К.К. Яцевич, Д.П. Бажанов // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 16. – Минск, 2013. – С. 113–120.

Исследована экспрессия генов катаболизма симазина бактерии *Herbaspirillum huttiense* B601 в клетках *E. coli*. Продемонстрирована конститутивная экспрессия гена симазинхлоргидролазы с собственного промотора в клетках гетерологичных хозяев. На основе хозяйственно-ценных бактерий сконструированы *in vitro* рекомбинантные штаммы-деструкторы симазина *Burkholderia* sp. 418-smzA и *Herbaspirillum frisingense* B416-smzA. Придание указанным штаммам способности к дехлорированию симазина расширяет спектр их полезных свойств, что дает возможность их применять на загрязненных симм-триазидами почвах.

Ключевые слова: *Herbaspirillum*, симазин, биодegradация, *smz* гены.

Yatsevich, K. Designing *in vitro* of recombinant strains-destructors by simazine / K. Yatsevich, D. Bazhanov // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 16. – Minsk, 2013. – P. 113–120.

Expression of simazine catabolic genes from *Herbaspirillum huttiense* B601 in cells of *E. coli* was investigated. Constitutive expression of simazine chlorohydrolase gene from native promoter in cells of heterologous hosts was shown. On basis of economical valuable bacteria, recombinant strains-destructors by simazine *Burkholderia* sp. 418-smzA и *Herbaspirillum frisingense* B416-smzA have been designed *in vitro*. The attachment of capability of simazine dechlorinating to strains 418 and B416 extends the range of their useful features, affording an opportunity of their using for purification of s-triazine contaminated soils.

Key words: *Herbaspirillum*, simazine, biodegradation, *smz* genes.

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 (ок). 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. Автоматическая расстановка переносов обязательна.

6. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.

7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS-Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).

8. Вставка в текст символов (например, β , ϵ) производится только через опцию «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C^2 , C_4) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются *курсивом*. Математические формулы (\lim , \sum , \sin , и т.д.) и цифры набираются прямым начертанием.

9. Печатать в сложных словах дефис (минерал-индикатор, К-пространство). Тире отбивают с обеих сторон неразрывным пробелом как знак препинания между словами: система «человек — машина», «май — июнь». Тире между цифрами, напр., 20–30 чел. — не отбивается.

10. Кавычки по всему тексту должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбивают от заключенных в них слов.

11. При подготовке к печати графиков, блок-схем, диаграмм, файлы должны быть поименованы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и какими по порядку рисунками статьи являются. Графики должны иметь толщину всех линий не менее 0,2 пункта для четкого воспроизведения. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, не допускается использование сканированного текста.

12. Необходимо предоставить электронные файлы фотоматериалов, а также распечатки лазерным принтером всех иллюстраций на листе формата А4. Отсканированные фотоиллюстрации серой, черно-белой цветовой модели должны иметь разрешение 600 dpi и формат TIFF.

13. Список цитированных источников располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок д.б. написаны внутри квадратных скобок. (напр.: [1]).

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 16

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 15.11.2013. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 15,11. Уч.изд. л. 9,50. Тираж 100 экз. Заказ № 119.
Оригинал-макет подготовлен ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/51 от 08.10.2013 г.
220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Отпечатано в ООО «НиктаграфиксПлюс»
ЛП № 02330/0494134 от 03.04.2009 г.
220034, г. Минск, пр-т. Машерова, 11