

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 19**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2015

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: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2015. – Т. 19. – 120 с. – ISSN 1999-9127.

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

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

Редакционная коллегия:

А.В. Кильчевский – главный редактор, Л.В. Хотылева – зам. главного редактора;
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.П. Ермишин,
А.И. Ковалевич, Ф.И. Привалов, А.В. Сукало, 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, Н.И. Дубовец, В.В. Титок, И.П. Шейко,
О.Н. Харкевич – члены редколлегии;
И.В. Широкая – ответственный секретарь.

УДК [577.21 + 575] (082)

ISSN 1999-9127

Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси, 2015

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Н.А. Некрашевич, К.К. Яцевич, С.В. Малышев, О.Г. Бабак, А.В. Кильчевский</i> Разработка молекулярных маркеров для ДНК-идентификации аллельного состава генов, контролирующих тип роста и развитие боковых побегов томата (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	7
<i>Ф.И. Привалов, Э.П. Урбан, С.И. Гордей</i> Основные результаты и перспективы использования биотехнологии в селекции сельскохозяйственных культур.....	13
<i>С.И. Вакула, Н.В. Анисимова, В.В. Титок, А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева</i> Использование доминантных мультилокусных маркеров для оценки генетического разнообразия льна масличного.....	25
<i>А.Н. Рабокоть, А.Е. Демкович, Я.В. Пирко, Я.Б. Блюм</i> Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений.....	35
<i>Е.А. Фомина, С.Н. Кулинкович, С.В. Малышев, О.Ю. Урбанович</i> Изучение аллельного разнообразия <i>TaCwi-A1</i> локуса в коллекции сортов и линий озимой пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	45
<i>О.А. Межнина, О.Ю. Урбанович</i> Изучение генетического разнообразия земляники садовой (<i>Fragaria ananassa</i>), выращиваемой в Республике Беларусь.....	53
<i>Н.С. Сихаева, Ж.М. Джармуханов, Е.В. Жолдыбаева, Е.М. Раманкулов</i> Частоты встречаемости аллельных полиморфизмов генов <i>ADRB2</i> , <i>FABP2</i> , <i>PPARG</i> , <i>FTO</i> , <i>ADRB3</i> и <i>APOA2</i> среди коренного населения Казахстана.....	59
<i>В.Н. Мартинков, А.Е. Силин, Э.А. Надыров, И.Б. Тропашко, А.А. Силина, С.М. Мартыненко</i> Генетическое тестирование мутаций <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> и <i>CHEK2</i> у пациенток с первично-множественным раком молочной железы.....	64
<i>Ю.М. Борисов, Е.В. Черепанова, И.А. Крищук, Е.С. Гайдученко, М.Е. Никифоров, О.О. Григорьева, В.Н. Орлов</i> Влияние климатических изменений в послеледниковье на ареалы хромосомных рас обыкновенной буроzubки, <i>Sorex araneus</i> L. (Mammalia) в Беларуси.....	69
<i>А.В. Ткачѳв</i> Цитогенетический статус жеребцов под влиянием допустимых уровней микотоксинов корма.....	79

<i>Е.В. Белая, М.Е. Михайлова</i> Межпородный сравнительный анализ ассоциации гена каппа-казеина с признаками молочной продуктивности у коров голштинской и черно-пестрой пород.....	84
<i>К.В. Гомель, Т.Е. Павлющук, М.А. Павловская, М.Е. Никифоров</i> Генетическое разнообразие и дифференциация популяций тетерева Белорусского и Украинского Полесья	90
<i>Н.В. Воронова, В.И. Головенчик</i> Разработка ПЦР-ПДРФ таблиц на основе последовательности гена <i>EF1a</i> для идентификации видов тлей – вредителей сельскохозяйственных растений	100
Рефераты.....	110
Правила оформления статьи.....	118

CONTENTS

<i>N.A. Nekrashevich, K.K. Yatsevich, S.V. Malyshev O.G. Babak, A.V. Kilcheuski</i> Molecular Markers Development for DNA-Identification of Allelic Composition of the Genes Controlling the Type of Growth and Development of Lateral Shoots in Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	7
<i>F.I. Pryvalau, E.P. Urban, S.I. Hardzei</i> The Basic Results and Prospects of Biotechnology Use in Breeding of Agricultural Crops	13
<i>S.I. Vakula, N.V. Anisimova, V.V. Titok, A.V. Kilcheuski, L.V. Khotyleva</i> The Use of Dominant Multilocus Markers for Assessment of Flaxseed Genetic Diversity	25
<i>A.N. Rabokon, A.Ye. Demkovich, Ya.V. Pirko, Ya.B. Blume</i> Intron Length Polymorphism of β -tubulin Gene as an Effective Tool for Genotyping of Plants.....	35
<i>E.A. Fomina, S.N. Kulinkovich, S.V. Malyshev, O.Yu. Urbanovich</i> The Study of Allelic Diversity of the <i>TaCwi-A1</i> Locus in the Collection of Winter Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) Varieties and Lines.....	45
<i>O.A. Mezhnina, O.Yu. Urbanovich</i> The Study on Genetic Diversity of Strawberry (<i>Fragaria ananassa</i>), Grown in the Republic of Belarus.....	53
<i>N.S. Sikhayeva, Zh.M. Dzhamukhanov, E.V. Zholdybayeva, E.M. Ramankulov</i> The Occurrence Frequencies of Allele Polymorphisms in <i>ADRB2</i> , <i>FABP2</i> , <i>PPARG</i> , <i>FTO</i> , <i>ADRB3</i> and <i>APOA2</i> Genes among the Indigenous Population of Kazakhstan	59
<i>V.N. Martinkov, A.E. Silin, E.A. Nadyrov, I.B. Tropashko, A.A. Silina, S.M. Martynenko</i> Genetic Testing for Mutations of <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> and <i>CHEK2</i> in Patients with Multiple Primary Breast Cancer.....	64
<i>Yu.M. Borisov, E.V. Cherepanova, I.A. Kryshchuk, H.S. Gaiduchenko, M.E. Nikiforov,</i> <i>O.O. Grigoryeva, V.N. Orlov</i> The Influence of Postglacial Climatic Changes on Distribution Ranges of Chromosomal Races of Common Shrew, <i>Sorex araneus</i> L. (Mammalia) in Belarus.....	69
<i>A.V. Tkachev</i> The Cytogenetic Status of Stallions under the Influence of Permissible Mycotoxin Levels in Feed	79
<i>E.V. Belaya, M.E. Mikhailava</i> The Interpedigree Comparative Analysis of the Association of Kappa-casein Gene with Milk Productivity Traits in Holstein and White-and-black Cattle Breeds	84

K.V. Homel, T.E. Pavlushchik, M.A. Pavlovska, M.E. Nikiforov
Genetic Diversity and Differentiation of Black Grouse Populations from Belarusian and Ukrainian Polesye..... 90

N.V. Voronova, V.I. Golovenchik
PCR-RFLP Keys for Aphid Species Identification Based on Sequences of *EF1a* Gene 100

Summaries 110

Instructions to authors 118

Н.А. Некрашевич, К.К. Яцевич, С.В. Малышев, О.Г. Бабак, А.В. Кильчевский

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ТИП РОСТА И РАЗВИТИЕ БОКОВЫХ ПОБЕГОВ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.)

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

Введение

Особенности роста и развития надземной части растения, определяющие его габитус, в условиях дикой природы направлены на эффективное использование ресурсов окружающей среды, таких как солнечная радиация, вода, элементы минерального питания. Представители вида *Solanum lycopersicum* имеют широкий спектр изменчивости по данному признаку. Встречаются различные формы: от низких супердетерминантных до лиановидных. Богатое разнообразие форм обусловлено полиморфизмом ряда структурных и регуляторных генов, определяющих рост и развитие побегов. Создание и отбор форм томата человеком также направлены на эффективное использование антропогенных ресурсов, вид и количество которых определяется технологией возделывания.

Выращивание томата в условиях защищенного грунта характеризуется сложностью технологии и высокими энергозатратами. Большие объемы ручного труда приходятся на формирование и подвязку индетерминантных гетерозисных гибридов. Несвоевременное проведение этого технологического приема приводит к нерациональному использованию питательных веществ. Кроме того, места удаления переросших пасынков могут способствовать проникновению инфекции в растения. Исходя из этого, можно сделать вывод, что оптимальным габитусом для условий защищенного грунта характеризуются сорта с индетерминантным типом роста и ограниченным развитием боковых побегов.

В настоящее время в литературных источниках описаны мутантные аллели генов *Self-pruning* (*Sp*), *Blind* (*Bl*) и *Lateral suppressor* (*Ls*), детерминирующие рост и развитие главного

и боковых побегов томата [1–3]. Разработка методологических основ ДНК-идентификации аллельного состава генов, способствующих ограниченному формированию пасынков у томата, представляет важный практический интерес. Использование разработанных молекулярных маркеров позволит быстро и эффективно отбирать интересующий селекционный материал для дальнейшего изучения и вовлечения в схемы скрещиваний.

Таким образом, целью наших исследований явилась разработка методологических основ ДНК-типирования генов, детерминирующих тип роста и развитие боковых побегов томата.

Материалы и методы

Для проведения исследований использовались коллекционные образцы и гибриды F_1 лаборатории экологической генетики и биотехнологии Института генетики и цитологии НАН Беларуси, а также образцы томата, полученные из Центра генетических ресурсов томата (Калифорния, США).

На основании последовательностей, опубликованных в базе GeneBank, разработаны ДНК-маркеры к мутантным аллелям генов *Self-pruning*, *Lateral suppressor*, *Blind*, проведена их апробация на коллекции образцов Центра генетических ресурсов томата и типирование коллекционных образцов и гибридов F_1 Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

ДНК выделяли из свежесрезанных листьев растений набором «Нуклеосорб» комплектации С (Праймтех, Беларусь), согласно методике, рекомендованной производителем. Растительную ткань предварительно измельчали на гомогенизаторе TissueLyser II, концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре Ultrospec 3300 *pro*.

В работе использованы праймеры, разработанные с помощью программы Vector NTI Suite 7.0.

Реакционная смесь для проведения ПЦР (15 мкл) включала 50 нг ДНК, 250 нМ каждого из пары праймеров, 200 нМ dNTP, 7,5 мкл 2x PCR буфера для Tornado полимеразы, 1 ед.

Tornado полимеразы (Праймтех, Беларусь). ПЦР проводили в амплификаторе iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) по программе, представленной в таблице. Температура отжига и время элонгации подбирались индивидуально для каждой пары праймеров.

Условия амплификации ДНК с используемыми праймерами

№	Этап		Температура, °С	Время, с
1	Денатурация		95	900
2	Денатурация	35x	99	1
3	Отжиг		49–56	30
4	Элонгация		72	30–120
5	Элонгация		72	300
6	Охлаждение		16	300

Электрофорез проводили в 1,2–3%-ном агарозном геле в стандартном трис-боратном буфере. Гели окрашивали этидиум бромидом и фотографировали при просвечивании ультрафиолетовыми лучами с помощью системы GelDoc 2000 (Bio-Rad). При ДНК-типировании аллеля *to-1* продукт амплификации разделяли с помощью капиллярного электрофореза на секвенаторе ABIPRISM®310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Результаты и обсуждение

Разработка молекулярных маркеров для ДНК-типирования гена *Self-pruning*

Вегетативная и репродуктивная фазы роста томата последовательно повторяются во время симподиального роста побега. У растений с диким индетерминантным типом роста соцветия разделяются тремя вегетативными узлами. У детерминантных растений, гомозиготных по рецессивному аллелю гена *Self-pruning*, симподиальные сегменты прогрессивно развивают меньшее количество узлов вплоть до того, что побег заканчивается двумя последовательными соцветиями. Ген *sp* является томатным ортологом гена *Terminal flower 1*, который поддерживает индетерминантное состояние меристемы соцветия у арабидопсиса. Мутация *sp* вызвана заменой одиночного нуклеотида (SNP), который приводит к аминокислотной замене и появлению нефункционального белка [1]. Кроме того, в нуклеотидной последовательности *sp*-

мутантного аллеля появляется дополнительный сайт рестрикции для эндонуклеазы *MvaI*.

На основании ДНК-последовательности мРНК (U84140) и информации о расположении интронов *sp* гена для идентификации мутации был разработан CAPS-маркер (spF/spR):

spF CTGTCCAAGTGTTAAGATG

spR CTGTAGTGCCTGGAATGT.

Амплификация с этими праймерами приводит к синтезу фрагмента длиной 1030 п.н. После рестрикции эндонуклеазой *MvaI* у растений дикого индетерминантного типа образуются фрагменты 396, 624 и 10 п.н, а у мутантного детерминантного фенотипа *sp* – 1020 и 10 п.н. [4].

На рис. 1 представлены результаты ДНК-типирования, в результате которого у семи протестированных коллекционных линий Центра генетических ресурсов томата (LA3903, LA0059, LA3451, LA3901, LA3133, LA3541, LA3802) обнаружен мутантный аллель *sp*.

Разработка молекулярных маркеров для ДНК-типирования гена *Lateral suppressor*

Основываясь на литературных данных о влиянии гена *Lateral suppressor* на ограниченное развитие боковых побегов томата, нами проведена разработка ДНК-маркеров для ПЦР-идентификации его мутантных аллелей *ls¹* и *ls²* [2].

Мутация *ls¹* вызвана обширной делецией приблизительно 1,5 т.п.о., в результате чего у мутантных форм происходит потеря функциональной активности регуляторного белка семейства VNIID, что негативно сказывается на активности меристем в пазухах побега.

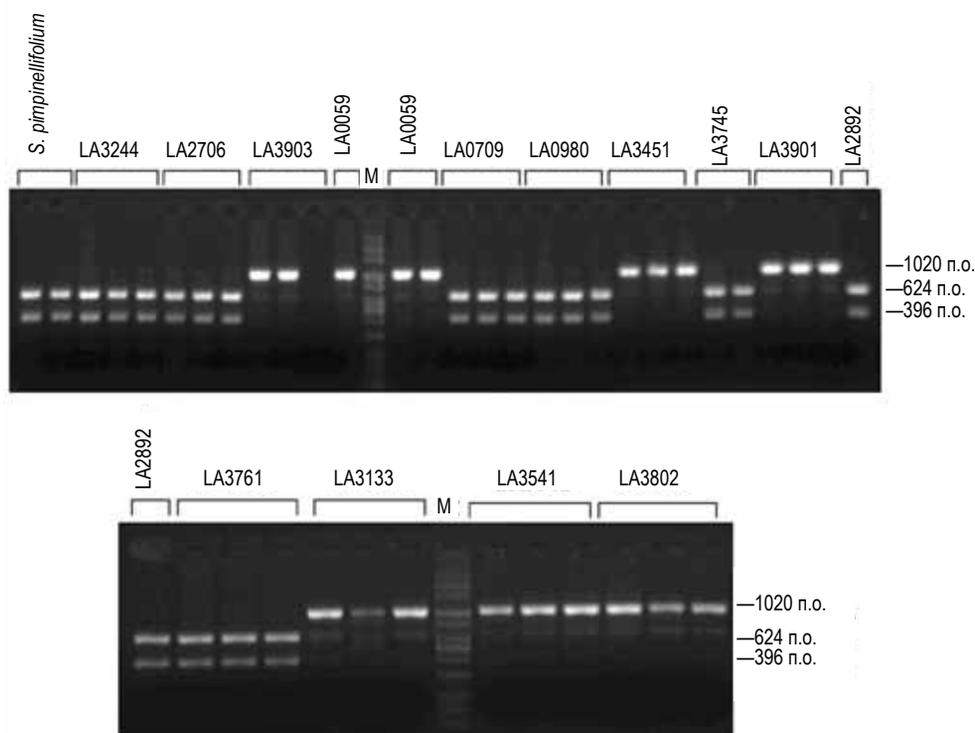


Рис. 1. Результаты амплификации ДНК коллекционных образцов томата с праймерами spF/spR и последующей рестрикции эндонуклеазой *MvaI*

Мутация ls^2 вызвана заменой нуклеотидной последовательности ЦААЦАГЦГ в позиции 203–210 на последовательность ТАААА-АЦГГАА. В результате транзиции Ц на Т в позиции 203 у мутантного аллеля появляется стоп-кодон, что в свою очередь приводит к преждевременной терминации трансляции и образованию неактивного белка. Кроме того, в нуклеотидной последовательности ls^2 -мутантного аллеля появляется дополнительный сайт рестрикции для эндонуклеазы *Tru1I*.

На основании ДНК-последовательности хромосомы (AJ303345), информации о расположении гена *Ls* и расположении мутации ls^1 был разработан SCAR-маркер (*ls1-3512F/ls1-5347R*):

ls1-3512F ATCTCAACCCTAATGAGTGA
ls1-5347R CCGATAAATACCAACACTCT.

В результате амплификации с праймерами *ls1-3512F/ls1-5347R* синтезировался фрагмент длиной 1836 п.о. у растений дикого типа и размером 287 п.о. у растений, несущих мутантный аллель ls^1 . На рис. 2 представлены электрофореграммы разделения полученных ПЦР-продуктов в агарозном геле. Нами об-

наружены два коллекционных образца Центра генетических ресурсов томата – LA2892 и LA3761 – с мутантным аллелем ls^1 , что подтверждает эффективность использования разработанного маркера.

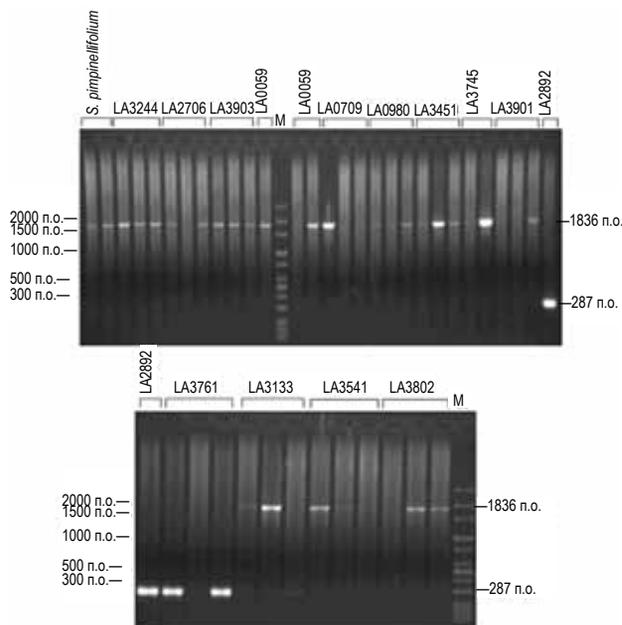


Рис. 2. Результаты амплификации ДНК коллекционных образцов томата с праймерами *ls1-3512F/ls1-5347R*

На основании ДНК-последовательности мРНК (AF098674) гена *Ls* и информации о локализации и характере мутации у аллеля *ls*² разработан CAPS-маркер (*ls*2-123F/*ls*2-582R):

*ls*2-123F TGAATGATATGTTAGGATCC

*ls*2-582R TGAGTAAACCTTATGAAAGG.

В результате амплификации с указанным маркером синтезируется фрагмент длиной около 460 п.о. После рестрикции амплифицируемого фрагмента эндонуклеазой *Tru11* у образцов, несущих мутантный аллель *ls*², происходит расщепление ампликона на два фрагмента размером 380 п.о. и 81 п.о. У растений дикого типа не происходит уменьшение длины ПЦР-продукта.

На рис. 3 представлены результаты апробации разработанного маркера на коллекционных образцах Центра генетических ресурсов томата. Согласно полученным данным, у образца LA3901 идентифицирован мутантный аллель *ls*².

Разработка молекулярных маркеров для ДНК-типирования гена *Blind*

Известно, что ген *Blind* кодирует фактор транскрипции MYB, контролируя тем самым образование боковых меристем у растений томата. Мутации в данном гене вызывают

потерю активности регуляторного белка, тем самым блокируя формирование боковых меристем и образование боковых побегов. На данный момент в литературе имеется описание трех мутаций гена *Blind*:

а) мутация *bl-1*, вызванная делецией размером 37 п.о. в позиции 427–463 на кДНК дикого аллеля *Blind* (AF426174);

б) мутация *bl-2* (*to-2*), вызванная делецией размером 34 п.о. в позиции 395–428 на кДНК дикого аллеля *Blind* (AF426174);

в) мутация *to-1* вызванная делецией в 1 п.о. в позиции 820 на кДНК дикого аллеля *Blind* (AF426174) [3].

На основании нуклеотидной последовательности мРНК гена *Blind* (AF426174) и информации о расположении мутации *bl-1* нами был разработан SCAR-маркер *bl1-397F/bl1-575R*:

bl1-397F CTCAAGAAAAGCTCATGGG

bl1-575R GCTGGAATAATAATGGGCTG.

В результате ПЦР с указанными праймерами у растений дикого типа амплифицируется фрагмент длиной 179 п.о., у растений с мутантным аллелем *bl-1* – 142 п.о. На рис. 4 представлены результаты ДНК-типирования образцов коллекции Института генетики и цитологии и

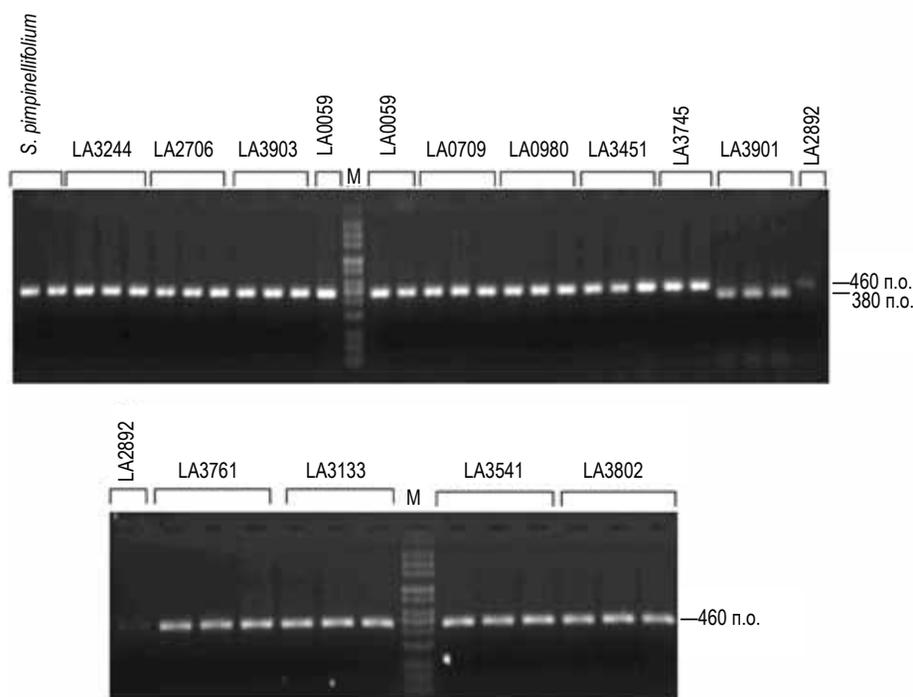


Рис. 3. Результаты амплификации ДНК коллекционных образцов с праймерами *ls*2-123F/*ls*2-582R и последующей рестрикции эндонуклеазой *Tru11*

контрольных образцов коллекции Центра генетических ресурсов томата (Калифорния). Показано, что у гибридов первого поколения, полученных при скрещивании с образцом Мо 516, несущим мутантный аллель *bl1*, разработанный маркер позволяет выявлять мутантный аллель *bl-1* в гетерозиготном состоянии.

На основании ДНК-последовательности AF426174 (мРНК гена *Blind*) и информации о расположении мутации *bl-2 (to-2)* разработанный SCAR-маркер (bl2-321F/bl2-451R):

bl2-321F AAGCAGGTGGTCAATTATAGCG
bl2-451R AAGAAGAAGAAGAATTGT.

Данный маркер позволил идентифицировать мутантный аллель *bl-2 (to-2)* в исследуемой коллекции. У растений дикого типа синтезировался фрагмент длиной 131 п.о., у образцов с аллелем *bl-2 (to-2)* – размером 97 п.о. Полученные результаты подтвердили наличие образца LA0980, содержащего мутантный аллель *bl-2 (to-2)* (рис. 5).

Для разработки SCAR-маркера (to1-785F/to1-895R) к участку делеции мутации *to-1* использовалась информация о ДНК-последовательности

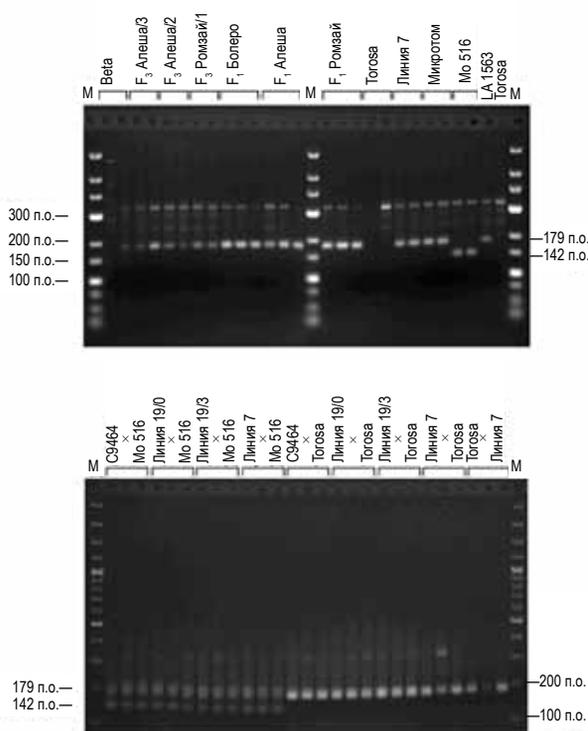


Рис. 4. Результаты амплификации ДНК коллекционных образцов томата с праймерами bl1-397F/bl1-575R

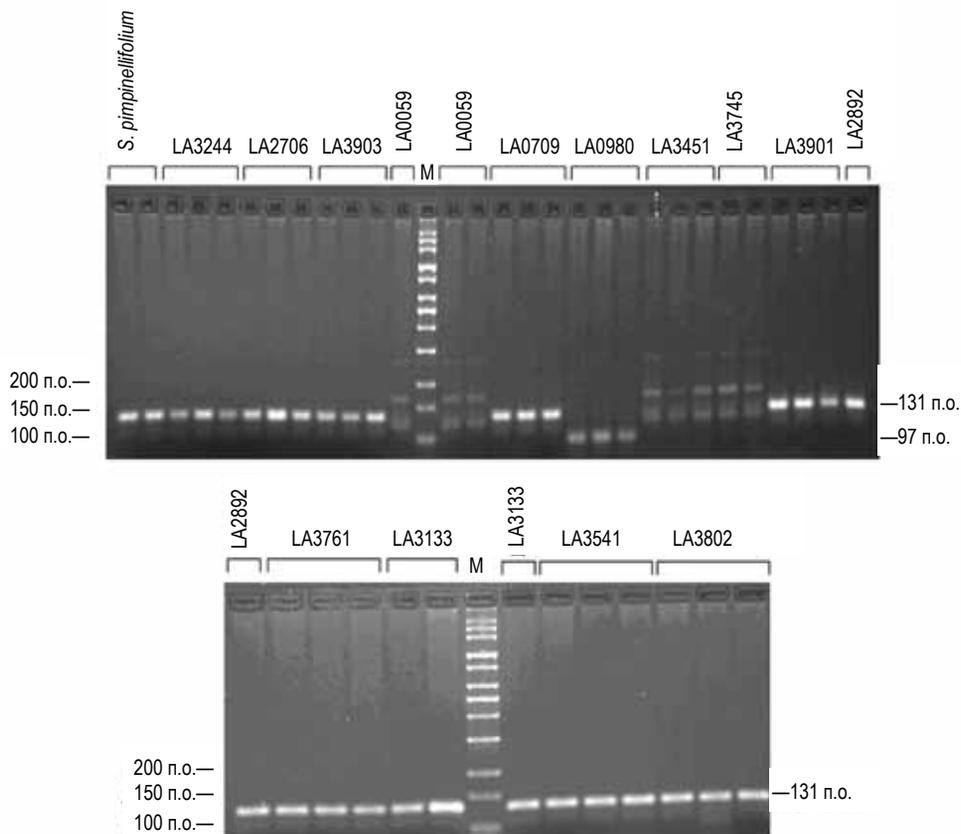


Рис. 5. Результаты амплификации ДНК коллекционных образцов томата с праймерами bl2-321F/ bl2-451R

мРНК гена *Blind* (AF426174). С применением программы Vector NTI Suite 7.0 были подобраны следующие последовательности праймеров, фланкирующие участок однонуклеотидной делеции:

to1-785F TTATGAGTTTTGGTGGTCATC

to1-895R AACTTGTAGCAATCTCCTGC.

Ожидалось, что в результате проведения ПЦР с этими праймерами у образцов с диким аллелем будет синтезироваться фрагмент длиной 111 п.о. и размером 110 п.о. – у растений с мутантным аллелем *to-1*. В результате проведения амплификации и разгонки продукта ПЦР на секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) было выявлено, что ни одна из протестированных коллекционных линий томата не содержала мутантный аллель *to-1*, у всех протестированных линий синтезировался фрагмент амплификации размером 111 п.о. (рис. 6).

Таким образом, в результате проведенного исследования разработаны праймеры и подобраны оптимальные условия для амплифи-

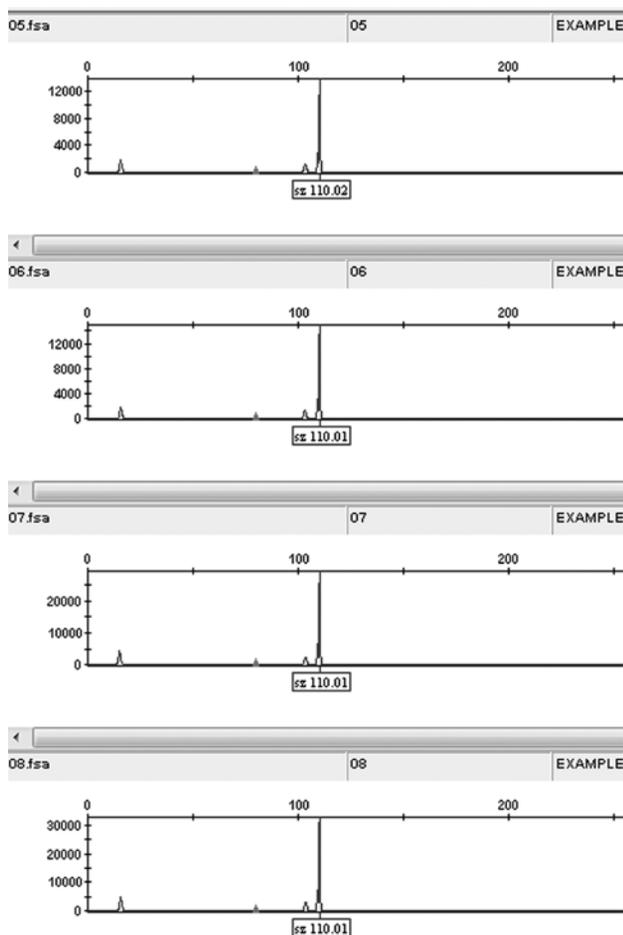


Рис. 6. Результаты амплификации ДНК коллекционных образцов томата с праймерами to1-785F/to1-895R

кации мутантных аллелей генов *Self-pruning* (*Sp*), *Lateral suppressor* (*Ls*) и *Blind* (*Bl*), определяющих тип роста и развития побегов.

Заключение

Разработаны молекулярные маркеры, позволяющие выявлять полиморфизм генов, контролирующих тип роста и развитие боковых меристем:

- CAPS-маркер к мутантному аллелю *sp* гена *Self-pruning*, детерминирующему тип роста главного побега;
- SCAR-маркер и CAPS-маркер к мутантным аллелям *ls¹*, *ls²* гена *Lateral suppressor*, контролирующим ограниченное развитие боковых побегов;
- SCAR-маркеры к мутантным аллелям *bl-1*, *bl-2* (*to-2*), *to-1* гена *Blind*, детерминирующим развитие боковых меристем томата.

В результате проведенного ДНК-типирования среди коллекционных образцов и гибридов F₁ выявлены образцы линий с ценными мутантными аллелями *sp*, *ls¹*, *ls²*, *bl-1* и *bl-2* (*to-2*) в гомо- и гетерозиготном состоянии.

Методологические основы ДНК-идентификации мутантных аллелей, детерминирующих тип роста и развитие боковых меристем, рекомендованы для ускоренного подбора селекционного материала при создании гибридов томата с пониженным пасынкообразованием.

Список использованных источников

1. The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1 / L. Pnueli [et al.] // *Development*. – 1998 Jun. – Vol. 125(11). – P. 1979–1989.
2. The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family / K. Schumacher [et al.] // *Plant Biology*. – 1999. – Vol. 96. – P. 290–295.
3. The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems / G. Schmitz [et al.] // *PNAS*. – 2002. – Vol. 99. – P. 1064–1069.
4. Разработать технологии ДНК-типирования генов высокого качества плодов и создать с их применением гетерозисные гибриды томата: отчет о НИР (заключ.) / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, рук. А.В. Кильчевский. – Минск, 2011. – 115 с. – № ГР 20110123.

Дата поступления статьи 9 августа 2015 г.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР (Обзорная статья)

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Введение

Основными составляющими повышения результативности селекции являются:

- экологизация селекции;
- разработка, освоение и использование в технологиях селекционных процессов современных генетико-биотехнологических методов;
- ускорение создания сортов (фитотронно-тепличные комплексы);
- повышение информативности селекционных процессов на базе компьютерных средств и информационных технологий;
- формирование национальной базы генетических ресурсов сельскохозяйственных растений;
- материально-техническая и приборная модернизация.

В современном мире биотехнология является одним из главных направлений инновационного развития во многих мировых отраслях экономики. Потенциальные возможности и сферы применения биотехнологии поставили эту отрасль в один ряд с нанотехнологиями и сделали ведущим фактором развития как экономик отдельных стран, так и мировой экономики в целом. Анализ мировых тенденций инноваций показывает, что сегодня наиболее динамично развивается именно рынок биотехнологической продукции. В то же время удельный вес Республики Беларусь в совокупном объеме мирового экспорта биотехнологической продукции составляет менее 0,01%. Стагнация в инновационной сфере, и в особенности в АПК, в немалой степени связана с недостаточным вниманием к интенсификации и продвижению инноваций в реальный сектор экономики. Инновационные проекты должны быть направлены на решение проблем, связанных с глобальными вызовами.

Таковыми, в первую очередь, являются проблемы питания, насыщение мирового аграрного рынка при стремительно возрастающей населенности планеты.

Применительно к селекции растений, анализ мировых тенденций по созданию новых сортов показал, что подавляющее большинство современных сортов и гибридов связано с использованием биотехнологических методов. Применение обычных методов селекции (внутривидовая гибридизация и отбор) на современном этапе развития уже не позволяет создавать конкурентоспособные сорта и, соответственно, внедрять их в производство. Сегодня без использования генетико-биотехнологических подходов не представляется возможным конкурировать с такими западно-европейскими и американскими селекционными фирмами, как “Monsanto”, “KWS”, “Saaten Union”, “Dieckmann and Co. KG”, “Bayer” и др., у которых неотъемлемой составной частью селекционного «конвейера» является биотехнологическое подразделение.

В последние годы в мире далеко продвинулись новые направления биотехнологии, связанные с результатами изучения функционирования генетического аппарата клетки (геномика), внутриклеточных белков (протеомика), надмолекулярных структур, отдельных клеток, а также проблем нанобиологии (новые нанобиоматериалы). Именно на этой основе в западных селекционных организациях широко используются молекулярно-генетические и биотехнологические методы при создании новых сортов растений.

Развитие биотехнологического сектора в селекции растений является весьма актуальным направлением для Республики Беларусь.

В Беларуси для эффективного создания новых высокопродуктивных конкурентоспособных сортов и гибридов сельскохозяйственных культур с высоким качеством продукции, устойчивых к стрессовым факторам, болезням и вредителям, необходимо использовать следующие молекулярно-генетические и биотехнологические методы:

- генная инженерия;
- создание трансгенных растений;
- ДНК-технологии;
- отдаленная гибридизация;
- экспериментальная гаплоидия;
- культура *in vitro* органов и тканей;
- индуцированный мутагенез и рекомбинация.

В Республике Беларусь есть все предпосылки и возможности для создания и использования новых конкурентоспособных высокоэффективных биотехнологий, не уступающих лучшим зарубежным аналогам.

Основными видами сельхозкультур как в Беларуси, так и на мировом рынке являются: пшеница, тритикале, рожь, ячмень, овес, кукуруза, рапс, гречиха, горох. Внимания заслуживает также люпин – один из основных источников обеспечения белком. Мировой рынок контролируют пять стран-экспортеров (США, Канада, Австралия, Аргентина и ЕС), представленные несколькими крупнейшими транснациональными зерновыми корпорациями.

В РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» совместно со многими научными учреждениями Беларуси в течение последних десятилетий существенно расширилось использование генетико-биотехнологических методов при создании сортов сельскохозяйственных культур в рамках различных программ. Наиболее значимые теоретические и практические результаты получены по ряду заданий ГП «Инновационные биотехнологии», которая затрагивает многие сферы экономики: медицину, здравоохранение, пищевую промышленность, образование, сельское хозяйство (животноводство, земледелие и растениеводство).

В данной статье изложены теоретические и практические результаты по использованию генетико-биотехнологических методов в селекции таких культур, как люпин, тритикале, овес, пшеница, эспарцет, рожь.

ЛЮПИН ЖЕЛТЫЙ (*LUPINUS LUTEUS*)

Внесенные в Государственный реестр Республики Беларусь сорта кормового люпина не в полной мере отвечают требованиям производства, прежде всего по причине неустойчивости урожайности по годам, в значительной степени связанной с поражаемостью рядом болезней (антракнозом, бурой пятнистостью, серой гнилью и др.). Антракноз, вызванный двумя американскими разновидностями патогена (*VCG 1*, *VCG 2*), представляет собой чрезвычайно опасное заболевание для производителей средиземноморских видов люпина во многих странах мира.

Благодаря быстрому развитию, антракноз в считанные дни способен повредить посевы люпина на огромных площадях. Так, из-за эпифитотии этой болезни в 1997–2000 гг. было прекращено возделывание желтого люпина в Беларуси [1].

Биологический метод защиты кормового люпина от болезней, сочетающий использование генетического потенциала толерантных растений и антагонистических свойств микроорганизмов, является наиболее приемлемым и актуальным [2].

Для успешного экспериментального синтеза у люпина желтого признаков «толерантность» и «толремность» к двум американским разновидностям возбудителя антракноза *Colletotrichum lupine* var. *lupini* и var. *setosum* нами использовались популяции F_2 и потомство старших поколений гибридов от скрещивания компонентов биологического банка генов (БГБ) этих видов люпина.

С целью усовершенствования существующих в мировой практике методов отбора устойчивых к антракнозу генотипов люпина нами разработан микробиологический экспресс-метод, позволяющий сократить время, необходимое для получения результатов оценки на толерантность люпина к антракнозу до 5 суток.

Предложенный метод состоит из 3-х этапов: 1) приготовление инокулюма гриба *Colletotrichum lupini*; 2) инфицирование семян люпина; 3) проращивание семян и учет степени поражения растений люпина (рис. 1).

Кроме того, этот экспресс-метод дает возможность оценивать на толерантность к антракнозу потомство элитных растений, линии, сортообразцы, сорта люпина.

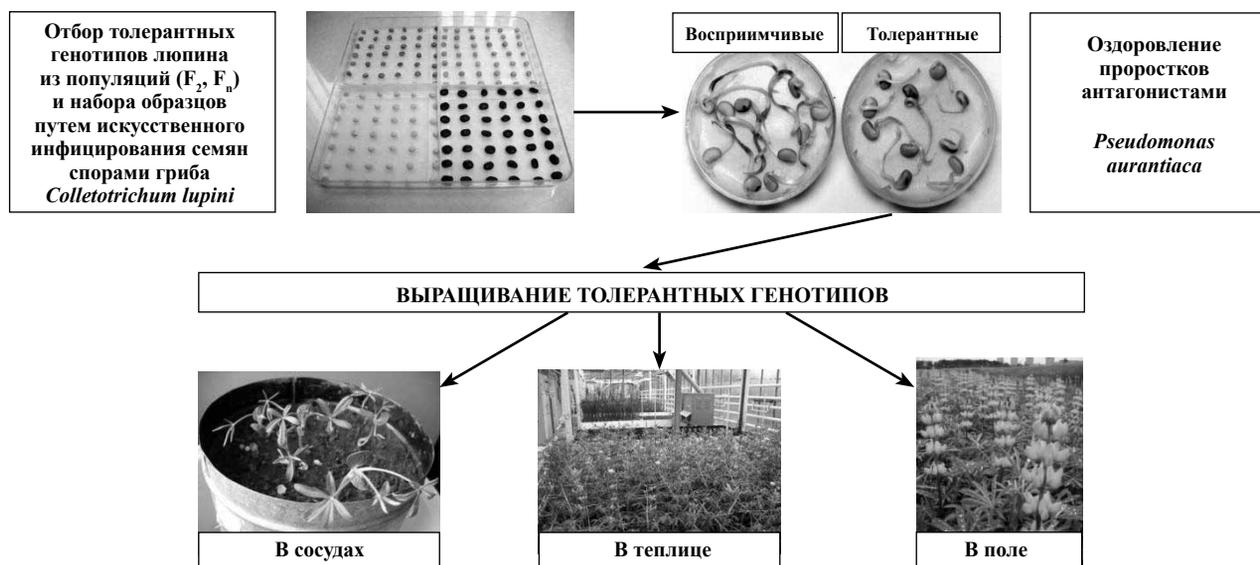


Рис. 1. Микробиологический экспресс-метод отбора *in vitro* толерантных к антракнозу генотипов люпина

С помощью микробиологического экспресс-метода проанализировано 33 генотипа F₃ желтого люпина, из которых отобрано 7 толерантных к антракнозу образцов. Все 7 образцов желтого люпина подверглись дальнейшему изучению в контрольном питомнике, а 4 из них – конкурсному сортоиспытанию. Проведение с помощью алкалоид-чувствительной бумаги качественного анализа содержания алкалоидов в вегетативной сфере растений люпина желтого во время бутонизации показало, что все изученные генотипы люпина желтого являются сладкими.

В результате проведенных исследований выделен устойчивый к антракнозу образец люпина желтого ЛЛТ-2 (табл. 1), который за годы изучения (2010–2012 гг.) существенно превысил стан-

дартные сорта люпина (Першацвет, Миртан) по сбору белка с урожаем семян (на 2,9 и 3,1 ц/га), сбору сухого вещества зеленой массы (на 20,4 и 11,8 ц/га, соответственно), и имеет тенденцию к превышению стандартов по урожайности семян. Сортообразец люпина желтого ЛЛТ-2 имеет белые семена шаровидной формы, желтые цветки и пурпурную (насыщенно антоциановую) окраску семядолей, стебля и листьев.

С позиции современной таксономии сортообразец ЛЛТ-2 относится к новой подразновидности разновидности *var. leucospermus* Kurl. et Stankev. – *Flores lutei. Semina albi*. Цветки желтые. Семена белые.

Образец люпина желтого ЛЛТ-2 в 2013 г. передан в Госсортоиспытание как сорт под названием **Владко** (рис. 2).

Таблица 1

Урожайность семян и сбор сухого вещества зеленой массы сортообразца люпина желтого ЛЛТ-2 (КСИ 2010–2012 гг.)

№	Сорт	Урожайность семян, ц/га						Период вегетации, суток	Сбор белка с урожаем семян, ц/га	Урожайность сухого вещества зеленой массы, 2010–2012 гг.	Толерантность, балл
		2010 г.	2011 г.	2012 г.	Среднее	+/- к st.1	+/- к st.2				
1	st.1 Першацвет	26,7	26,3	25,5	26,2			85	8,4	61,2	9
2	st.2 Миртан	28,9	20,4	24,8	24,7			91	8,2	69,8	9
3	ЛЛТ-2 (Владко)	30,5	28,2	26,0	28,2	+2,0	+3,5	97	11,3	81,6	7
HCP		4,7	4,0	2,6				—			



Рис. 2. Желтый люпин Владко (посев, бобы, семена)

ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОЕ (*TRITICOSECALE*)

Тритикале является самой молодой и вместе с тем ценной продовольственной и фуражной зерновой культурой для Республики Беларусь. Крайне важно сохранение приоритетных позиций, которые базируются на использовании генов-источников ценных признаков, а также применении генетико-биотехнологических методов при создании новых высокопродуктивных конкурентоспособных сортов.

Пшеницы *Triticum spelta* и *T. turgidum* являются уникальными источниками генов, определяющих кормовые и пищевые достоинства культуры, а также устойчивость к абиотическим факторам и болезням. Спельта, как и тритикале, относится к культурам, менее требовательным, по сравнению с мягкой пшеницей, к комплексу почвенно-климатических условий. В связи с этим, создание новых форм тритикале с использованием *T. spelta* и *T. tur-*

gidum позволит повысить кормовые достоинства зерна, устойчивость к основным видам заболеваний и стрессовым факторам среды.

Создание новых форм тритикале проводилось по следующей схеме (рис. 3)

Для решения поставленных задач использованы лучшие генетические источники по продуктивности (6–8 т/га), качеству зерна (15–16% белка), а также современные методы создания генетического разнообразия и отбора хозяйственно-ценных рекомбинантов. Для кормового тритикале вышеприведенные параметры и показатели соответствуют уровню лучших мировых аналогов.

Для проведения реципрокных скрещиваний в качестве родительских форм были привлечены гибриды F_1 , образцы озимого тритикале и образцы пшеницы видов *T. spelta* и *T. turgidum*. Для преодоления постгамной несовместимости использовали эмбриокультуру *in vitro*.

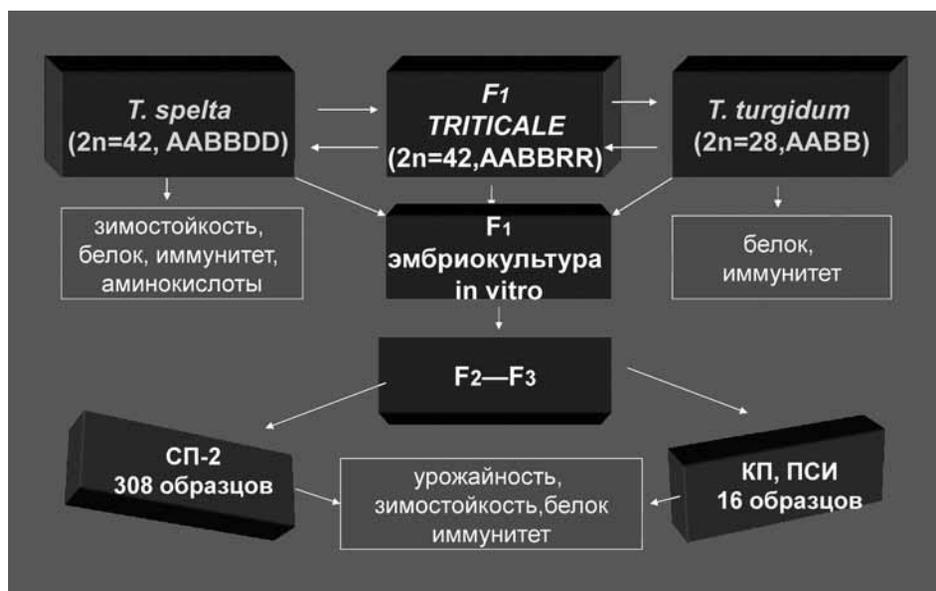


Рис. 3. Схема создания озимого тритикале кормового направления

После полиплоидизации и адаптации в искусственной почве «Биона 112» получен 131 регенерант F₁ по 14 комбинациям.

В результате комплексного изучения в течение нескольких лет по морфологическим, хозяйственно-полезным признакам созданных генотипов тритикале выделено шесть образцов, которые были испытаны в питомнике конкурсного испытания (табл. 2).

Как видно из таблицы, наибольшее превышение показал образец КП-312. Он также пре-

высил на 0,7% стандарт (Прометей) по содержанию белка в зерне. Данный образец передан как сорт озимого тритикале под названием **Жемчуг** в Госсортоиспытание Республики Беларусь.

Заслуживают внимания образцы КП-302 и КП-310, которые также достоверно превысили стандарт по зерновой продуктивности. Данные образцы включены в селекционный процесс для последующей проработки и испытания.

Таблица 2

Характеристика образцов тритикале по высоте растений и урожайности в питомнике КСИ

№ делянки	Сорт, № образца	Высота, см	Количество продуктивных стеблей, шт/м ²	Урожайность, ц/га	± к стандарту, ц/га
	Прометей	125	–	62,6	–
104	КП-302	103	735	68,1	+5,5
105	КП-309	128	750	60,8	-1,8
106	КП-310	125	665	68,0	+5,4
107	КП-312	127	665	72,4	+9,8
126	КП-531	103	525	53,9	-8,7
				<i>HCP</i> ₀₅ – 3,7 ц/га	

ОВЕС (*AVENA SATIVA*)

Овес посевной (*Avena sativa* L.) – важная зернофуражная культура, которая по сумме посевных площадей занимает пятое место в мире (11 млн. га) после пшеницы, риса, кукурузы и ячменя.

Генетический потенциал рода *Avena* позволяет на основе межвидовой гибридизации получать формы овса, обладающие высокими кормовыми характеристиками. Голозерные гексаплоидные образцы имеют высококачественное зерно и маркированы сцепленными генами, детерминирующими морфологические, визуально фиксируемые альтернативные признаки голозерности и многоцветковости, положенные в систематику этого вида. Использование межвидовой гибридизации с привлечением образцов диплоидного вида *A. strigosa* S. с использованием эмбриокультуры *in vitro* для преодоления постгамной несовместимости, полиплоидии и экспериментального мутагенеза позволяет создавать продуктивные гомозиготные сортообразцы и сорта голозерного овса кормового направления с высоким качеством зерна [3, 4, 5, 6]. *Avena strigosa* – это

дикий вид овса, который является донором генов устойчивости к основным видам грибных заболеваний, устойчивости к стрессовым факторам среды, низкой пленчатости зерновок.

Разработана и апробирована методика создания новых форм голозерного овса (рис. 4).

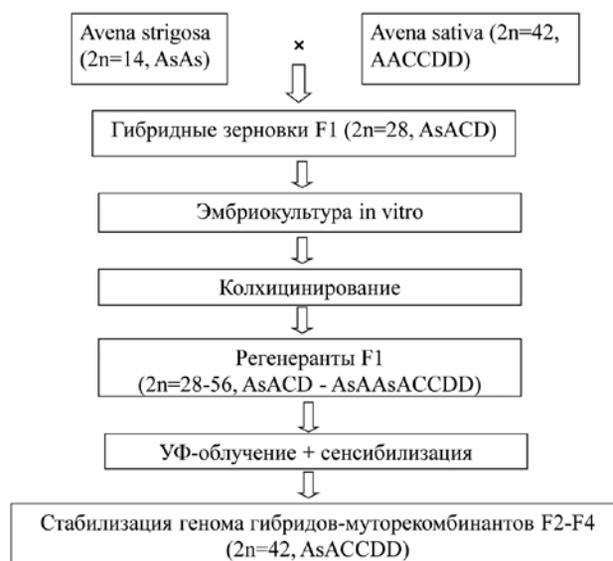


Рис. 4. Схема создания новых форм голозерного овса

В результате проведенных исследований с использованием отдаленной гибридизации, эмбриокультуры *in vitro* и экспериментального мутагенеза (УФ-облучение) получено 90 образцов по 20 межвидовым гибридным комбинациям *A. strigosa* ($2n = 14$, AsAs) \times *A. sativa* ($2n = 42$, AACDD), которые были изучены в селекционном процессе. Выделены перспективные образцы с наибольшей урожайностью: образец 1245 (PL51583 \times Adam) – 40,0 ц/га, образец 123 (PL51583 \times Adam) – 45,5 ц/га, при урожайности стандартного сорта Вандроўнік 33,0 и 34,0 ц/га, соответственно. Методом электрофореза установлена степень выравнивания и однородности созданных голозерных форм овса, отобрано 15 перспективных константных образцов. В лабораторных условиях проведена оценка зерновой продукции созданных образцов по содержанию белка, жира и аминокислотному составу.

Был выделен образец, обладающий максимальным выражением хозяйственно-полезных признаков, и передан в Государственное сортоиспытание в качестве сорта под названием **Королек**.

ПШЕНИЦА ЯРОВАЯ (*TRITICUM AESTIVUM*)

Проблема создания сортов пшеницы, характеризующихся высоким качеством зерна, остается актуальной и в наше время [7]. Существующие сорта гексаплоидной пшеницы характеризуются довольно низким содержанием белка лизина, что существенно снижает их биологическую ценность при производстве как источников продуктов питания, так и кормов. В мировой коллекции имеются формы пшеницы, обладающие высоким качеством зерна, однако они являются представителями других видов и, кроме того, обладают низкой продуктивностью. Это является препятствием для их использования в улучшении качества зерна сортов мягкой пшеницы.

Однако в последнее десятилетие в России В.А. Зыкиным были созданы перспективные формы мягкой пшеницы, характеризующиеся достаточно высокой урожайностью и высоким качеством зерна, причем важно, что эти ценные признаки были сцеплены с таким маркерным признаком, как фиолетовая окраска зерна [8]. Такое сцепление упрощает задачу гибри-

дизации и последующих отборов высокопродуктивных и одновременно высокобелковых и высоколизиновых форм, на основе визуального отбора продуктивных форм с фиолетовой окраской зерна, с дальнейшей оценкой их качества и наследования по потомству. Эти формы мягкой пшеницы предполагалось использовать в данной работе, включая их в гибридизацию с другими формами и видами (*T. durum*; *T. turgidum*) с последующим отбором селекционно-ценных генотипов.

Целью наших исследований являлось создание сорта кормовой пшеницы на основе генетических источников высокого содержания белка и лизина, индуцированного мутагенеза, рекомбиногенеза и направленного отбора рекомбинантных, высокопродуктивных форм с объединенным комплексом хозяйственно-полезных признаков, сцепленных с маркерным признаком фиолетовой окраски зерна.

Для проведения реципрокных скрещиваний в качестве родительских форм были привлечены образцы ярового тритикале, яровой пшеницы и гамма-мутанта пшеницы, маркированные фиолетовой окраской зерна (*Triticum aestivum*, var. *violaceum*). В среднем по 12 комбинациям скрещиваний завязываемость гибридных зерен составила 23,9%. Всего было получено 262 растения F_1 .

Для ускорения селекционного процесса в фазе «начало молочной спелости» незрелые зародыши этих 262 растений F_1 были высажены в условиях *in vitro* на искусственную среду Гамборга Р-8 В-5. Всего было высажено 1528 зародышей F_2 , что составило 85,7% от числа завязавшихся зерновок. Полученные в культуре *in vitro* гибридные растения F_2 были пересажены в ионообменный субстрат «Биона 112» и культивировались в световой комнате. Всего было получено 1366 фертильных растений F_2 , что составило 88,1% от числа высаженных зародышей.

Поскольку каждая комбинация представляла популяцию F_2 , то наблюдалось закономерное расщепление по окраске зерна, сцепленной с его качеством (табл. 3). Соотношение семян с желтой и фиолетовой окраской изменялось в зависимости от направления скрещиваний и вида исходных форм. В среднем по всему блоку оно составило отношение как 2,6 частей с фиолетовой и 1 часть с желтой окраской зер-

на, что близко к расщеплению как 3:1. Такой характер расщепления указывает на моногенную, доминантную природу фиолетовой окраски зерна. Из этого материала сформировано 10 популяций F_3 с желтой окраской зерна и 10 – с фиолетовой.

В результате дальнейшей работы по комплексному изучению созданных форм яровой пшеницы, маркированных фиолетовой окраской зерна, выделено 10 селекционно-ценных генотипов, которые испытывались в питомнике конкурсного испытания (табл. 3).

Таблица 3

Характеристика образцов яровой пшеницы по хозяйственно-полезным признакам (КСИ, 2012)

№ п/п	Сел. №	Септориоз колоса, балл	Устойчивость к полеганию, балл	Продуктивный стеблевой, шт/м ²	Высота, см	Урожайность, ц/га	± к стандарту, ц/га
Рассвет – ст.		3	9	775	105	52,45	–
1	ДФ-33	3	7	710	110	51,49	–0,96
2	ДФ-37	4	8	595	115	52,31	–0,14
3	ДФ-39	4	9	725	105	52,98	+0,53
4	ДФ-40	3	7	650	110	52,60	+0,15
5	ДФ-41	3	7	553	108	47,04	–5,41
6	ДФ-42	3	7	525	105	51,49	–0,96
7	ДФ-43	3	7	460	103	51,35	–1,10
8	ДФ-44	3	8	515	105	52,80	+0,35
9	ДФ-45	3	7	635	105	50,22	–2,23
10	ДФ-46	3	8	605	110	53,70	+1,25

Как видно из таблицы, четыре образца незначительно превысили стандарт по урожайности. Среди всех изученных образцов выделен образец ДФ-46. Несмотря на незначительное превышение над стандартом, данный образец характеризуется повышенным содержанием ряда аминокислот, в том числе незаменимых, что делает его более ценным по качеству продукции. Данный образец передан в ГСИ в качестве сорта под названием **Синтез** (рис. 5).

ЭСПАРЦЕТ (*ONOBRYCHIS ARENARIA*)

В настоящее время на территории Республики Беларусь нет районированных сортов эспарцета. Завозимые из-за пределов страны нерайонированные сорта эспарцета закавказского и песчаного в почвенно-климатических условиях Республики Беларусь не обеспечивают тот уровень продуктивности, который показывают в местах своего районирования, для которых они создавались [10]. Поэтому основная задача наших исследований – создание своих сортов, обеспечивающих макси-

мальную отдачу в условиях республики.

В основе проводимых работ лежит расщепление сортов-популяций различных видов эспарцета, отбор биотипов с нужными свойствами и объединение их в одном генотипе на основе межвидовой гибридизации с использованием современных биотехнологических методов, включая культуру *in vitro*.

Идея исследований заключалась в использовании селективных питательных сред для отбора нужных генотипов эспарцета, что существенно ускоряет селекционный процесс и сокращает объемы полевых экспериментов.



Рис. 5. Семена яровой пшеницы с фиолетовой окраской

Использовались среды Гамборга В5, МС, ШХ как с полным набором, так и с половинным ($\frac{1}{2}$) набором солей. В каждом варианте сред изучалось влияние различных стимуляторов роста, таких, как БАП, ИМК, НУК, 2,4-Д, кинетин. В качестве эксплантов использованы гипокотили 6-дневных проростков и пазушные меристемы взрослых растений.

Установлено, что среды МС и ШХ наиболее пригодны для выращивания эспарцета. Проростки хорошо чувствовали себя как на средах с полным набором солей, так и с $\frac{1}{2}$ набором. Экспланты предпочтительнее выращивать на среде, содержащей половинный набор солей и витаминов, так как при полном наборе солей большинство эксплантов сильно витрифицировались и становились непригодными для дальнейшей регенерации.

Проблемы ризогенеза у регенерантов решались с помощью добавления гормонов в различных вариантах и концентрациях.

С целью ускорения отбора устойчивых к неблагоприятным факторам генотипов гибридные растения эспарцета подвергались отбору *in vitro* на селективных средах при пониженном значении рН среды и присутствии ионов алюминия.

В результате отобрано 86 перспективных генотипов. Лучшие генотипы высаживались в искусственную почву для адаптации в течение 30–40 дней. После адаптации растения высажены для выращивания в полевом севообороте (рис. 6).

Таким образом, выявлены оптимальные солевые, витаминные и гормональные составляющие питательных сред, необходимые для успешного развития эксплантов и регенерантов. Также была установлена генспецифичность каллусообразования и интенсивности процессов регенерации в зависимости от вида и сорта эспарцета.

Практическим результатом проведенных исследований явилось выделение трех высокопродуктивных генотипов эспарцета песчаного, один из которых передается в ГСИ в качестве сорта под названием **Караневичский**.

РОЖЬ (*SECALE CEREALE*)

Использование эффекта гетерозиса у ржи – наиболее перспективное направление дальнейшего повышения потенциала урожайности этой культуры. В качестве биологического способа кастрации материнских растений при контролируемых скрещиваниях для получения гибридных семян, как известно, используют цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС) [11, 12]. На основе ЦМС создается соответствующая генетическая система, состоящая из стерильного аналога материнского компонента скрещивания, закрепителя стерильности (для поддержания и размножения стерильного аналога), восстановителя фертильности – отцовского компонента (рис. 7).

Большинство коммерческих гибридов создано на генетической основе ЦМС типа “Рапра”. Для полного восстановления

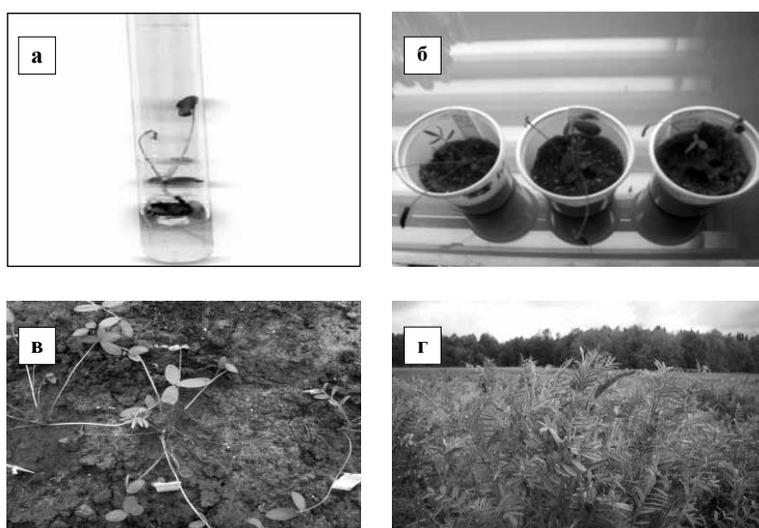


Рис. 6. Процесс создания селекционно-ценных образцов эспарцета с использованием биотехнологических методов: а – выращивание в пробирках; б – сосуды с искусственной почвой; в – закрытый грунт в условиях ФТК; г – размещение в полевых условиях

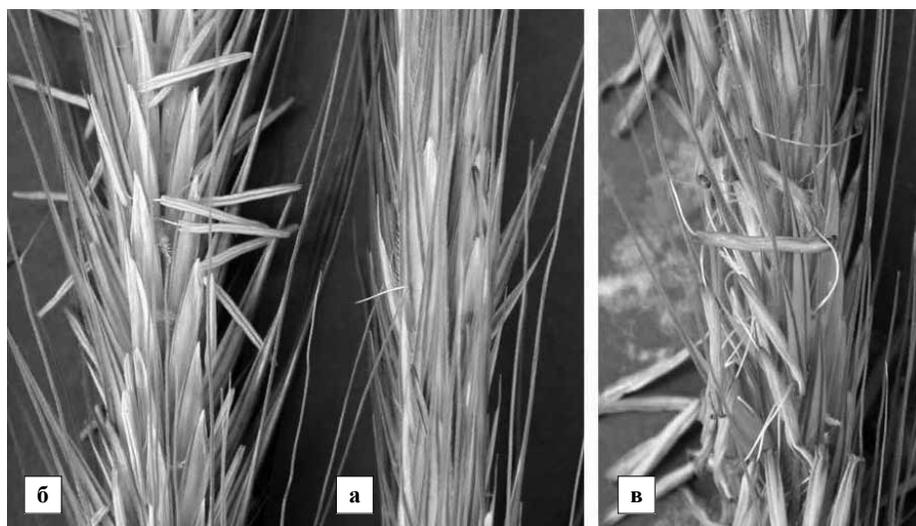


Рис. 7. Родительские компоненты гетерозисного гибрида F_1 ржи: а – мужски стерильная форма; б – закрепитель стерильности; в – восстановитель фертильности.

фертильности пыльцы для этой цитоплазмы требуются эффективные ядерные гены-восстановители. Однако частота эффективных генов-восстановителей мужской стерильности в европейском материале ниже 5% и, кроме того, их эффективность сильно подвержена влиянию среды [13, 14]. Частичное восстановление ЦМС приводит к уменьшению количества жизнеспособной пыльцы, что в свою очередь благоприятствует заражению спорыньей (*Claviceps purpurea*). Данная инфекция приводит к загрязнению ржаного зерна склероциями, содержащими токсичные алкалоиды [15]. Относительно недавно новые источники генов-восстановителей были описаны в примитивной популяции Иранской ржи (IRAN IX) и Аргентинской ландрасе (Pico Gentario). Данные источники проявляют значительно более высокий уровень восстановления, чем используемые в настоящее время европейские линии, и более высокую средовую стабильность.

Разработка и апробация методов ДНК-генотипирования важнейших селекционных генов производятся многими странами Европы. В последние годы разработана и активно применяется в селекционном процессе технология “Pollen plus”, которая заключается в использовании методов «ДНК-маркер-сопутствующего отбора» для контроля генов-восстановителей фертильности на всех стадиях селекции ги-

бридной ржи. Данные исследования открывают широкие возможности для создания линий-восстановителей с высоким индексом восстановления. С использованием новой технологии уже созданы новые гибридные сорта (Pollino, Visello, Palazzo, KWS-Bona и др). Эти сорта существенно превосходят ранее созданные по признаку фертильности и устойчивости к спорынье.

В связи с этим целью наших исследований являлась разработка и внедрение в селекционный процесс технологии ДНК-типирования генов-восстановителей ЦМС ржи и создание с ее применением эффективного восстановителя фертильности озимой диплоидной ржи как компонента для получения высокогетерозисных (15–20%) линейно-популяционных гибридных сортов.

Совместно ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» и РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» проводили создание эффективных восстановителей фертильности по следующим этапам:

- создание методов ДНК-типирования генов-восстановителей фертильности у ржи;
- оценка имеющегося отечественного генофонда систем ЦМС методами ДНК-типирования генов-восстановителей фертильности;
- подбор коллекции экзотических источников генов-восстановителей ЦМС из мирового генофонда ржи;

- маркерный анализ полученной коллекции, отбор перспективных источников генов-восстановителей;
- интрогрессия экзотических генов-восстановителей в элитные линии с высокими СКС и ОКС;
- оценка комбинационной способности стерильных аналогов и линий-восстановителей с помощью тестеров ЦМС;
- отбор лучших линий в диаллельных скрещиваниях.

В результате проведенных исследований разработана технология ДНК-типирования генов-восстановителей фертильности ЦМС у ржи.

Получен восстановитель фертильности озимой диплоидной ржи (НГ-502) на генетической основе системы ЦМС типа «Пампа» индексом восстановления 83–94%, за исключением одной комбинации скрещивания (табл. 4). Для ЦМС-линии СЛ-376 полученная форма является строгим закрепителем стерильности.

Таблица 4

Уровень фертильности пыльцы у гибридов F_1 озимой ржи от скрещиваний МС-тестеров с инцухт-линией НГ-502

№	Комбинация скрещивания	Число изученных пыльцевых зерен	Число фертильных пыльцевых зерен	Число стерильных пыльцевых зерен	Уровень фертильности пыльцы, %
1	СЛ-29 × НГ-502	627	558	69	89,0
2	СЛ-44 × НГ-502	988	844	144	85,4
3	СЛ-129 × НГ-502	1068	936	132	87,6
4	СЛ-193 × НГ-502	1045	952	93	91,1
5	СЛ-278 × НГ-502	1103	985	118	89,3
6	СЛ-329 × НГ-502	1351	1263	88	93,5
7	СЛ-358 × НГ-502	1340	1262	260	94,2
8	СЛ-376 × НГ-502	0	0	0	0,0
9	СЛ-383 × НГ-502	927	784	143	84,6
10	СЛ-396 × НГ-502	350	292	58	83,4

Созданная линия характеризуется высокой комбинационной способностью. Степень развития пыльников составляет 8–9 баллов по шкале Гайгера (рис. 8).

Данная самоопыленная линия включена в селекционный процесс для создания гибридных сортов ржи.

Заключение

Помимо результатов работы по описанным в статье культурам, получены теоретические и практические результаты по ряду других сельскохозяйственных культур, таких, как ячмень, пайза, капуста белокачанная, томаты, картофель, лен, соя и др. с участием многих научных и учебных учреждений. Результаты работы по использованию генетико-биотехнологических методов в селекции новых сортов и гибридов



Рис. 8. Линия ржи – носитель гена восстановления фертильности от Иранской дикой ржи (IRAN IX)

сельскохозяйственных растений говорят о большой перспективности дальнейшего развития данных исследований. Предстоящие основные направления генетики и биотехнологии в селекции растений можно сформулировать следующим образом:

- Разработка клеточных технологий для ускорения создания новых конкурентоспособных, высокопродуктивных и устойчивых сортов растений зерновых, зернобобовых, технических и кормовых культур.
- Разработка и оптимизация методов биоинженерии для ускоренного создания принципиально новых форм растений и на их основе высокопродуктивных и устойчивых гибридов и сортов зерновых, зернобобовых и кормовых культур мирового уровня.
- Использование геномики: разработка и оптимизация молекулярно-генетических методов для создания и характеристики

сортов и видов разных сельскохозяйственных культур на основе ДНК-маркеров.

- Усовершенствование биотехнологических подходов для ускоренного создания новых высокопродуктивных и устойчивых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур.

Для эффективного использования фундаментальных и прикладных генетико-биотехнологических разработок на практике необходима выработка правильной организационной структуры. Нам представляется наиболее приемлемым решением данного вопроса – организация селекционно-биотехнологического «конвейера», состоящего из нескольких блоков, секций, каждая из которых выполняла бы определенные функции (табл. 5) и являлась бы неотъемлемым звеном в «цепи конвейера».

Эффективность такой «схемы» работы доказана практикой западных селекционных фирм.

Таблица 5

Структура селекционно-биотехнологического «конвейера»

Блок (секция) 1	Блок (секция) 2	Блок (секция) 3	Блок (секция) 4	Блок (секция) 5
Культура органов и тканей <i>in vitro</i> : Эмбриокультура, Гаплоидия, Клональное микроразмножение	ДНК-технологии: ДНК-маркерная селекция, ДНК-типирование, ДНК-диагностика	Создание трансгенных растений, Теплица, Полигон	Блок камер искусственного климата для оценки образцов и отбора хозяйственно-ценных форм	Полевой селекционно-семеноводческий комплекс: Система машин по обработке земли, подготовке семян к посеву, посеву, уборке и доработке селекционно-семеноводческого материала

Список использованных источников

1. Купцов, Н.С. Люпин – генетика, селекция, гетерогенные посевы / Н.С. Купцов, И.П. Такунов. – Брянск, Клиницы: Изд-во ГУП «КГТ», 2006. – 576 с.
2. Frensel, L. Report of the first detection of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on lupins in Poland / L. Frensel // Plant Dis. – Vol. 82. – 1998. – P. 35.
3. Роль современных селекционных и генетико-биотехнологических методов в создании исходного материала и сортов овса и ячменя / М.П. Шишлов [и др.] // Мат. Межд.

науч.-практ. конф. «Принципы и методы оптимизации селекционного процесса сельскохозяйственных растений, 14-15 июля 2005, Жодино. – С. 107–114.

4. Шишлова, А.М. Преодоление постгамной несовместимости при межвидовых гетероплоидных ($2x \times 6x$) скрещиваниях овса / А.М. Шишлова, И.А. Гордей, М.П. Шишлов // Генетика. – Т. 29, № 1. – 1993. – С. 91–98.

5. Шишлова А.М. Создание новых форм голозерного овса на основе гетераплоидных ($2x \times 6x$) скрещиваний / А.М. Шишлова, М.П. Шишлов // Мат. 8 БелОГиС. – Минск, 2002. – С. 185–187.

6. Эффективность использования эмбриокультуры *in vitro* при создании межвидовых гибридов овса / А.М. Шишлова [и др.] // Сельскохозяйственная биотехнология. II Международн. научно-практическая конф. Горки, 3–6 декабря, 2001 г.: Мат. конф. – Горки. – 2002. – С. 323–325.
7. Shu, Q.Y. Plant Breeding and Genetics Newsletter. – 2007. – N. 19 – P. 14.
8. Прогресс и регресс в селекции яровой мягкой пшеницы в условиях Западной Сибири / В.А. Зыкин [и др.] // Селекция сельскохозяйственных культур. – Омск, 1987. – С. 56–61.
9. Чекель, Е.И. Адаптивный потенциал многолетних бобовых трав и селекция на его повышение // Стратегия и тактика экономической целесообразной адаптивной интенсификации земледелия: Материалы Международной научно-практической конференции. В 2-х т.; под общ. ред. доктора с.-х. наук Кадырова М.А. – Минск: УП «ИВЦ Минфина», 2004. – Т. 2. – С. 67–70.
10. Чекель, Е.И. Эспарцет: особенности возделывания / Е.И. Чекель, С.В. Абраскова, В.В. Крицкая. // Современные ресурсосберегающие технологии производства растениеводческой продукции в Беларуси: сб. науч. материалов, 2-е изд., доп. и перераб. / РУП Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». – Минск: ИВЦ Минфина, 2007. – С. 258–264.
11. Geiger, H.H. Hybrid rye and Heterosis / H.H. Geiger, T. Miedaner // Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. – Madison, Wisconsin, USA, 1999. – P. 439–450.
12. Geiger, H.H. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.) / H.H. Geiger, F.W. Schnell // Crop. Sci. – 1970. – Vol. 10. – P. 56–60.
13. Madej, L. Ocena plodnosci mieszancow zyta / L. Madej, R. Osinski, J. Jagodinski // Biuletyn Inst. Hodowli i Aklimat. Roslin. Radzikow, Poland. – 1995. – № 195/196. – P. 283–290.
14. Heterosis of factorial inter-pool-single cross among elite winter rye inbred lines / H.H. Geiger [et al.] // Proceedings of the Eucarpia Rye Meeting, Juli 4-7, 2001. – Radzikow, 2001. – P. 19–22.
15. Урбан, Э.П. Использование ЦМС Р- и G-типов в селекции и семеноводстве гетерозисных гибридов F_1 озимой ржи (*Secale cereale* L.) / Э.П. Урбан, С.И. Гордей // Земледелие и селекция в Беларуси – 2013. – № 49. – С. 349–358.
16. Development of simple and efficient in planta Transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* / P. Supartana [et al.] // Journal of bioscience and bioengineering. – 2005. – Vol. 100, № 4. – P. 391–397.
17. Development of a simple and efficient method for transformation of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* / M. Kojima [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000. – Vol. 64. – P. 845–847.

Дата поступления статьи 31 июля 2015 г.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОМИНАНТНЫХ МУЛЬТИЛОКУСНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

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

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

Введение

ДНК-маркеры революционизировали весь процесс генетических и селекционных исследований, впервые появилась возможность оценки популяции по большому количеству локусов, составления генетических карт, контролируемого отбора наиболее ценных особей. Диапазон доступных генетических маркеров очень широк (изоферменты, RFLPs, RAPDs, AFLPs, SNPs, SSR и т.д.) [1]. Полезность или необходимость каждой из маркерных систем в значительной степени зависит от доступных генетических ресурсов вида и имеет тенденцию изменяться по мере развития методов ДНК-анализа.

Первые этапы почти столетней истории генетических исследований льна культурного связаны с оценкой характера наследования признаков венчика, пыльников, и цвета семени [2, 3, 4]. В последующем пионерские работы Flog по устойчивости льна к возбудителю ржавчины *Melanospora lini* заложили фундамент современной науки о фитоиммунитете [5], Comstock предложил первую генетическую карту сцепления льна [6]. Развитие молекулярно-генетических методов позволило идентифицировать и клонировать некоторые гены, в частности, связанные с биосинтезом жирных кислот [7]. В настоящее время интенсивно развиваются молекулярные подходы к изучению генетики льна – проведены секвенирование, сборка и аннотация генома [8], опубликована первая консенсусная генетическая карта [9], ряд работ посвящен поиску QTL и ассоциативному картированию хозяйственно-ценных признаков [7, 10]. В общедоступных базах данных депонировано 286 899 ESTs, 10 970 секвенированных последовательностей ДНК и РНК, 80 339 концевых последователь-

ностей ВАС клонов льна культурного [12]. Особое место занимает оценка генетического разнообразия культуры и использование полученной информации для разработки стратегии его сохранения и рационального использования.

Двадцать пять генотипов, представленных в нашей коллекции льна масличного, составляют только $4,33 \times 10^{-4}$ часть от 53 000 образцов льна, депонированных в мировых банках генетических ресурсов [13]. Оценка разнообразия, сконцентрированного в таком небольшом наборе сортов, требует применения эффективных маркерных систем с высоким уровнем разрешающей способности и информативности, легко дискриминирующих уникальные генотипы.

Цель исследования – оценка генетического разнообразия коллекции сортов льна масличного с использованием двух маркерных систем – RAPD-ПЦР и ISSR-ПЦР. Обе системы представлены мультилокусными, доминантными маркерами с неизвестной локализацией в геноме [14], оценку их эффективности проводили с учетом трех аспектов: а) общая эффективность выявления полиморфизма; б) дискриминационная способность, то есть эффективность различения двух генотипов в изучаемом наборе сортов; в) способность маркерной системы прогнозировать генетические связи и сходство изучаемых образцов.

Материалы и методы

Растительный материал исследований – 25 генотипов льна масличного различного эколого-генетического происхождения: Antares, Mivast, Atalante (Франция); Blue Chip (Венгрия); Glenelg (Австралия); Deer Pink (Нидерланды); Linota, SU-1-10, Omega, (США);

К 5827 (Уругвай); Gold Flax, McGregor, Somme, Л-6582, К-6570, Flanders (Канада); Raluca, Sandra (Чехия); Суан (Польша); К-2398 (Китай); Воронежский, К-5627, Небесный, (РФ); ЛМ-1, ЛМ-2, (Беларусь).

Экстракцию и очистку ДНК проводили из навески 200 мг трех этиолированных проростков льна с использованием набора Genomic DNA Purification Kit #K0512 (Thermo Scientific, США) согласно инструкции изготовителя. Для дополнительной очистки использовали протеиназу К (из расчета 0,1 мкг на 1 мкл раствора для лизиса клеток), трихлорметан.

Реакционная смесь ПЦР объемом 15 мкл содержала: 50 мМ KCl; 20 мМ трис-HCl (pH 9,0); 2,5 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого dNTP; 0,01 нМ праймера; 1 ед. Taq-полимеразы, 10–15 нг ДНК для RAPD-ПЦР и 50–100 нг для ISSR-ПЦР. Нуклеотидные последовательности RAPD- и ISSR-праймеров представлены в табл. 1.

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Professional Basic (Biometra, Германия) в следующем температурном режиме: RAPD-ПЦР: начальная денатурация – 4 мин при 94 °С; 40 циклов: 94 °С – 4 мин; 94 °С – 1 мин, 37 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин; терминальная элонгация – 4 мин 72 °С. ISSR-ПЦР: начальная денатурация 4 мин при 94 °С; 35 циклов: 94 °С – 50 с, 48–56 °С – 50 с, 72 °С – 1 мин 10 с; терминальная элонгация – 4 мин

72 °С. Оптимальные температуры отжига для ISSR-праймеров определяли по результатам проведения ПЦР в градиенте температур 48–56 °С. Продукты амплификации разделяли в 1,8%-ном агарозном геле.

Эффективность генетических маркеров (RAPD, ISSR) для оценки и описания полиморфизма коллекции льна масличного оценивали по параметрам, предложенным в работах Powell et al. [15], Bootstein et al. [16], Morgante et al. [17], Tessier et al. [18]. Сравнение средних значений проводили с использованием двустороннего *t*-критерия Стьюдента в программной среде Statistica 10.0 (StatSoft, США). На основании суммарной бинарной матрицы генетического анализа с помощью программного пакета DarWin 6.0 по алгоритму невзвешенного парно-группового среднего (UPGMA) были рассчитаны матрицы сходства генотипов в дистанциях Жаккарда и построены иерархические агломеративные дендрограммы. Функционалы качества иерархической кластеризации были рассчитаны автоматически с использованием программных пакетов Darwin 6.0 [19] и T-REX online [19]. Для оценки соответствия генетических связей, выявленных с использованием двух маркерных систем, были использованы процедуры MAST (Maximum agreement sub-tree) [20] и Quartet tree distance [21], реализованные в программном пакете Darwin 6.0.

Таблица 1

Олигонуклеотидные праймеры, использованные для анализа

№	Название	Последовательность	Температура, °С
1	ISSR 2	CAGCAGCAGCAGCAG	56,0
2	ISSR 4a	GAGAGAGAGAGAGAYC	47,0
3	ISSR 5	AGAGAGAGAGAGAGAGG	50,9
4	ISSR 6	GAGAGAGAGAGAGAGAT	53,4
5	ISSR 8a	GTGTGTGTGTGTGTGYC	52,2
6	ISSR 11	AGAGAGAGAGAGAGAGC	50,0
7	ISSR 12	ACACACACACACACC	51,0
8	ISSR18	AGCAGCAGCAGCAGGCC	47,0
9	ISSR 9	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	55,0
10	ISSR 9a	CTCCTCCTCCTCCTCCTCA	50,2
11	ISSR 22	ACACACACACACACAA	54,5
12	ISSR 24	ACACACACACACACTC	52,3
14	ОПАН 13	TGAGTCCGCA	37
15	ОПАФ 16	TCCCGGTGAG	37

Продолжение табл. 1

№	Название	Последовательность	Температура, °C
16	OPW 19	CAAAGCGCTC	37
17	OPAH 14	TGTGGCCGAA	37
18	ССРВ 270	GGTCGATCTG	37
19	UBC 194	AGGACGTGCC	37
20	OPA 12	TCGGCGATAG	37
21	OPB 01	GTTTCGCTCC	37

Для описания уровня информативности каждого доминантного маркера использовали следующие статистические показатели:

Электрофоретическая подвижность (ЭП), количество полиморфных локусов (N_p), количество мономорфных локусов (N_{np}), количество спектров маркера (T_p).

Общее число локусов (L) вычисляли по формуле:

$$L = N_p + N_{np};$$

Фракция полиморфных локусов (β):

$$\beta = N_p / L [15];$$

Фиксированные рецессивные локусы (V_r):

$$V_r = n_0 / N [22];$$

Индекс информативности (PIC):

$$PIC = 1 - \sum p_i^2,$$

где p_i – частота i -того ампликона,
 n – число локусов [16];

Маркерный индекс (MI):

$$MI = \beta \times PIC [15];$$

Разрешающая способность (R_p):

$$R_p = \sum I_b,$$

$$I_b = 1 - (2 \times |0,5 - p|) [15];$$

Эффективное количество аллелей (n_e):

$$n_e = 1 / \sum p_i^2 [17];$$

Вероятность неопределенности (C_j):

$$C_j = p_i ((Np_i - 1) / N - 1),$$

где p_i – частота i -того спектра,
 N – число генотипов [18];

Дискриминационная способность (D_j):

$$D_j = 1 - C_j [18];$$

Дискриминационный предел (DL)

$$DL = \lim (D_j) = 1 - \sum p_i^2;$$

Эффективное количество спектров (P):

$$P = 1 / (1 - DL);$$

Для описания маркерной системы использовался показатель среднее количество паттернов (I), а также нижеследующие, вычисляемые по формулам:

Общее число эффективных аллелей (N_e):

$$N_e = \sum n_e [23];$$

Эффективное мультиплексное отношение (E):

$$E = L_u / \beta,$$

где L_u – сумма локусов [15];

Эффективный индекс (A_i):

$$A_i = N_e / U,$$

где U – число праймеров [23].

Результаты и обсуждение

С использованием двух маркерных систем получено 218 ампликонов (94 и 124 для RAPD- и ISSR-ПЦР, соответственно), из которых полиморфны 120 (53 и 67 для RAPD- и ISSR-ПЦР, соответственно). В зависимости от праймера, ПЦР обеспечивала синтез от 5 (ISSR 9a) до 18 (Ubc 194) фрагментов в диапазоне электрофоретической подвижности

120–1700 bp. Высокая доля полиморфных локусов отмечена для праймеров: ISSR 2 (93,8%), Opa16 (81,82%), ISSR 18 (80,0%), Opa1 01 (66,67%), ISSR 22 (63,64%), Opa19 (63,64%), ISSR 9a (60,0%). Основные статистические показатели эффективности праймеров в описании полиморфизма рабочей коллекции льна масличного представлены в табл. 2.

Таблица 2

Параметры генетической изменчивости, выявляемые с использованием RAPD- и ISSR-праймеров при анализе рабочей коллекции льна масличного

Праймер	ЭП	L	N _p	N _{np}	β	V _r	PIC	R _p	n _e	T _p	C _j	D _j	DL
Ubc 194	200–1600	18	8	10	0,44	0,26	0,12	3,21	1,20	15	0,06	0,94	0,91
Scpb 270	200–1200	12	7	5	0,58	0,46	0,18	3,07	1,30	16	0,08	0,92	0,89
Opa 12	250–1300	11	5	6	0,45	0,25	0,16	2,64	1,27	11	0,10	0,90	0,87
Opa16	300–1110	11	9	2	0,82	0,36	0,33	5,50	1,58	27	0,00	1,00	0,96
Opa14	120–1050	12	7	5	0,58	0,29	0,15	2,29	1,22	9	0,22	0,78	0,75
Opa1 01	150–670	9	6	3	0,67	0,35	0,19	2,36	1,31	10	0,15	0,85	0,82
Opa13	350–950	10	4	6	0,40	0,34	0,09	1,14	1,13	7	0,37	0,63	0,66
Opa19	200–1550	11	7	4	0,64	0,18	0,16	2,21	1,23	12	0,18	0,82	0,79
ISSR 2	350–1050	15	14	1	0,93	0,47	0,22	4,14	1,34	14	0,16	0,84	0,81
ISSR 4a	250–1100	16	8	8	0,50	0,27	0,16	3,14	1,26	14	0,06	0,94	0,90
ISSR 5	300–670	8	2	6	0,25	0,19	0,07	1,00	1,13	3	0,45	0,55	0,53
ISSR 11	390–650	8	3	5	0,38	0,17	0,11	1,29	1,18	6	0,22	0,78	0,67
ISSR 12	450–1270	8	4	4	0,50	0,25	0,15	1,71	1,25	7	0,28	0,72	0,69
ISSR 6	200–1000	10	5	5	0,50	0,18	0,11	1,43	1,16	8	0,60	0,40	0,39
ISSR 8a	450–1050	7	2	5	0,29	0,24	0,06	0,57	1,10	3	0,55	0,45	0,44
ISSR 9	550–1600	7	1	6	0,14	0,05	0,06	0,64	1,11	2	0,42	0,58	0,56
ISSR 9a	950–1500	5	3	2	0,60	0,29	0,14	1,07	1,24	3	0,13	0,87	0,81
ISSR 18	350–1100	15	12	3	0,80	0,46	0,23	4,50	1,36	13	0,32	0,68	0,66
ISSR 22	400–1200	11	7	4	0,64	0,45	0,11	1,57	1,16	8	0,10	0,90	0,87
ISSR 24	450–1700	14	6	8	0,43	0,33	0,13	2,79	1,22	11	0,31	0,69	0,75

Число эффективных аллелей на праймер (n_e) отражает уровень ожидаемой гетерозиготности популяции и достигает максимума при равной частоте встречаемости всех аллельных вариантов. Для доминантных маркеров n_e принимает значения от единицы до двух, но при анализе нашей коллекции показан значительно более узкий диапазон разброса значений n_e – 1,10–1,58 (ISSR 8a, OPAF 16, соответственно), что свидетельствует о сравнительно невысоком уровне ожидаемой гетерозиготности сортов коллекции. Показатель n_e достоверно коррелирует ($r=0,5$) с количеством

фиксированных рецессивных локусов (V_r), частота которых не превышала 0,46 для RAPD- и 0,47 для ISSR-маркеров, и в среднем составила 0,30, что указывает на сравнительно высокое генетическое разнообразие, представленное в рабочей коллекции. Для генотипов частота фиксированных рецессивных аллелей варьировала от 0,25 (Cyan) до 0,37 (K-6570), что ниже результатов, полученных при анализе выборок генофонда канадского [24] и американского льна [25] (51,2% и 45,3%, соответственно), а также 17 сортов льна-долгунца белорусской селекции (40,4%) [26].

Общее число эффективных аллелей N_e было использовано для расчета общего эффективного индекса (A_i), характеризующего информативность маркерной системы в описании исследуемого генофонда. Эффективный индекс составил 1,28 для RAPD-ПЦР, 1,21 – для ISSR-ПЦР, 1,24 – в среднем для двух маркерных систем, таким образом, информативность использованных систем ДНК-анализа составляет 64,0; 60,5 и 62,0% (от максимального $A_i = 2$), соответственно.

Для доминантных маркеров информационный индекс (PIC) принимает значения от 0 до 0,5. Высокое значение PIC показано для RAPD-праймера Oraf 16 (0,36), ISSR-праймеров, амплифицирующих последовательности, расположенные между тринуклеотидными повторами генома – ISSR 2 (PIC = 0,22), ISSR 18 (PIC = 0,23). Низкоинформативны для описания рабочей коллекции льна маркеры ISSR 9 и ISSR 8a (PIC = 0,06 для обоих праймеров).

Оценка разрешающей способности праймера (R_p) позволяет идентифицировать праймеры, наиболее эффективно различающие генотипы. Среднее значение R_p использованных нами маркеров составило 2,31, высокий эффект в разделение генотипов вносят высокополиморфные праймеры Oraf 16, ISSR 18, ISSR 2. Показатели R_p достоверно коррелируют со статистикой, описывающей информативность праймеров – PIC ($r = 0,9$).

Количество уникальных ДНК-спектров для каждого праймера (T_p) варьировало от 2 (ISSR 9) до 27 (Oraf 16), средний показатель по коллекции – 7,67 спектров/праймер. Теоретически, в наборе из N генотипов можно выделить $N \times (N - 1) / 2$ пар ДНК-паттернов. Исходя из соотношения T_p / L , высокое разнообразие спектров характерно практически для всех использованных в анализе RAPD-праймеров. Небольшое количество высокочастотных спектров может свидетельствовать о попадании сайтов связывания праймеров в участки ДНК, подвергавшиеся давлению очищающего отбора,

например 9 ампликонов праймера ISSR 9 организованы всего в два паттерна, представленных в коллекции в соотношении 19:9.

Вероятность неопределенности (C_j) и противоположный ей показатель дискриминационной способности (D_j) отражают вероятность наличия у двух генотипов идентичных паттернов и эффективность дискриминации генотипов на основании данных спектров амплификации. По двадцати праймерам C_j составила 0–0,55, с минимумом для праймеров Oraf 16, Ubc 194, ISSR 4a, Cspb 270, эти же маркеры характеризуются высокой дискриминационной способностью относительно исследованных генотипов льна. Высока вероятность неопределенности ($C_j > 0,5$) для праймеров ISSR 9 и ISSR 8a.

Для генерируемых праймером различных ДНК-паттернов предложен расширенный показатель PIC – предел дискриминационной способности (DL). Высокой спектральной информативностью ($DL \geq 0,9$) характеризуются праймеры Cspb 270, ISSR 4a, Ubc 194, Oraf 16, наименее показательны паттерны, генерируемые праймерами ISSR 6 и ISSR 8a.

Сравнение параметров RAPD- и ISSR-анализа в отношении выявления полиморфизма и дифференциации генотипов льна рабочей коллекции представлено в табл. 3. В целом, по сравнению с ISSR-, RAPD-маркеры амплифицируют больше фрагментов, с более высоким уровнем выявляемого полиморфизма и характеризуются более широкой зоной электрофоретической подвижности, кроме того, более высоким уровнем информативности и разрешающей способности, однако, согласно t -критерию, выявленные различия средних статистически незначимы (при $\alpha < 0,05$). Средние значения спектральных характеристик маркерных систем T_p , C_j , D_j и DL, различаются достоверно, таким образом, в отношении исследуемой коллекции льна масличного RAPD-ПЦР характеризуется значимо более высокой дискриминационной способностью.

Таблица 3

Эффективность маркерных систем RAPD и ISSR в оценке полиморфизма рабочей коллекции льна масличного

Параметр	RAPD-ISSR	RAPD	ISSR	t (RAPD-ISSR)
L	11,04	11,75	10,33	0,91
N_p	6,11	6,63	5,58	0,68

Продолжение табл. 3

Параметр	RAPD и ISSR	RAPD	ISSR	<i>t</i> (RAPD и ISSR)
N_m	4,94	5,13	4,75	0,37
EMR	0,54	0,57	0,50	0,86
V_r	0,30	0,31	0,28	0,60
PIC	0,15	0,17	0,13	1,56
R_p	0,21	0,24	0,18	1,37
N_e	1,25	1,28	1,21	1,45
T_p	10,53	13,38	7,67	2,39*
C_i	0,22	0,14	0,30	-2,37*
D_i	0,78	0,86	0,70	2,37*
DL	0,75	0,83	0,67	2,44*

В работах Powell et al. [15] показатель, характеризующий фракцию и количество полиморфных локусов на анализ, носит название эффективного мультиплексного отношения (EMR). EMR – это показатель эффективности выявления ДНК-полиморфизма маркерной системой. Применительно к рабочей коллекции льна масличного и общего набора 20 доминантных маркеров (RAPD+ISSR) значение EMR составило 5,74, для набора RAPD-праймеров этот показатель выше – 6,74, для ISSR – только 5,13. По сравнению с использованным набором ISSR-праймеров, проведенный RAPD-анализ более эффективен в дифференциации генотипов льна, что подтверждают значения маркерных индексов систем ($MI = 0,74$ и $MI = 0,99$, ISSR и RAPD, соответственно).

Результаты RAPD- и ISSR-типирования

коллекции сортов льна масличного сведены в бинарную матрицу и проанализированы по алгоритму иерархического кластерного анализа UPGMA с использованием дистанций Жаккарда. На основе межсортовых дистанций построены дендрограммы кластеризации (рис. 1, 2), рассчитаны погрешности анализа и функционалы качества объединения образцов (табл. 4).

Обе дендрограммы (RAPD, ISSR) характеризуются низкими показателями погрешностей кластеризации и высокими коэффициентами кофенетической корреляции, что характеризует высокое соответствие проведенного кластерного анализа UPGMA матрице межсортовых дистанций. При построении RAPD-дендрограммы получены максимальное и минимальное значения дистанций Жаккарда и сумма длины ветвей выше на 19,4; 5,7 и 26% соответствующих показателей ISSR-дерева.

Таблица 4

Функционалы качества кластеризации генотипов льна

Параметр	RAPD	ISSR
Минимальное значение матрицы дистанций	0,072	0,058
Максимальное значение матрицы дистанций	0,367	0,346
Сумма длины ветвей	2,389	1,888
Средняя погрешность	0,000	-0,001
Средняя абсолютная погрешность	0,025	0,023
Максимальная абсолютная погрешность	0,094	0,110
Квадрат средней абсолютной погрешности	0,001	0,001
Коэффициент кофенетической корреляции, r^k	0,871	0,910

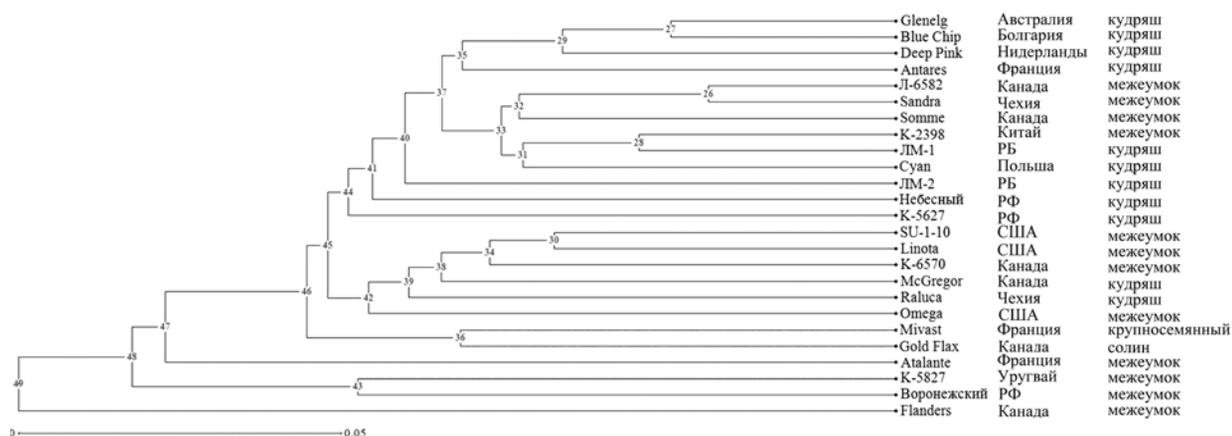


Рис. 1. Иерархическая дендрограмма кластеризации сортов льна масличного, полученная на основе RAPD-анализа

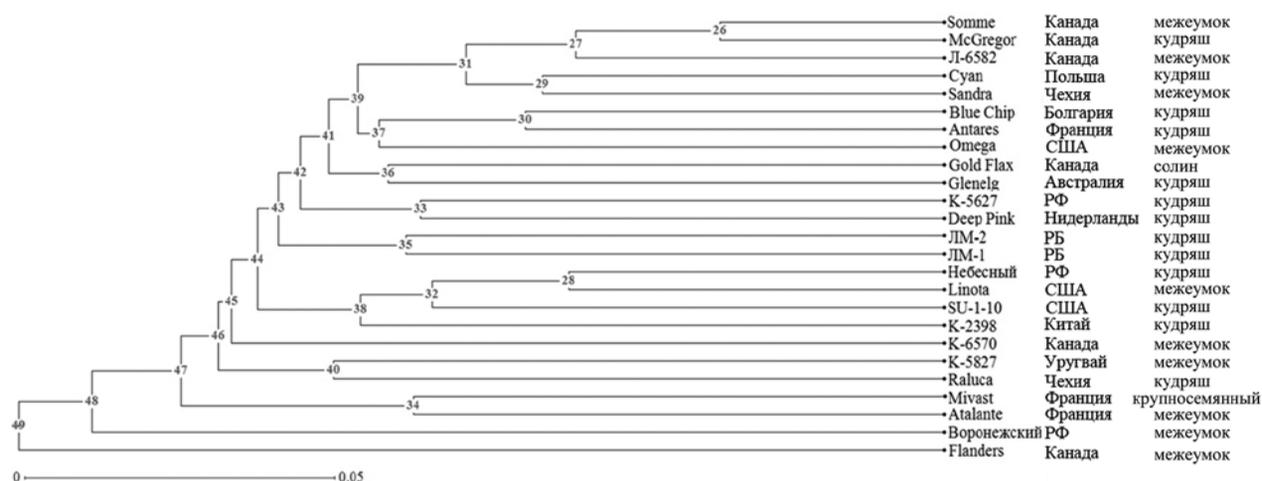


Рис. 2. Иерархическая дендрограмма кластеризации сортов льна масличного, полученная на основе ISSR-анализа

При соотношении топологии RAPD- и ISSR-дендрограмм с географическим происхождением изучаемых сортов, в частности, показана высокая генетическая общность американских (SU-1-10, Linota), белорусских (ЛМ-1 и ЛМ-2), французских (Mivast и Atalante) сортов. Относительно невысокой межкластерной дисперсией характеризуются группы сортов селекции РФ, восточноевропейских стран, Канады. Оценка генетических связей, соответствующих таксономической дифференциации исследуемого генофонда льна масличного показала, что в структуре ISSR-дендрограммы сорта, относящиеся к подвидам лен-кудряш и лен-межеумок, образуют отдельные субкластеры, а представители подвидов лен-крупносемянный (Mivast) и солин (Gold Flax)

формируют отдельную группу. Полиморфизм RAPD-спектров в выявлении таксономической принадлежности сортов менее показателен.

Различия между двумя деревьями генетической классификации измеряли в «дистанциях квартетов» (quartet distance QDist), отражающих количество подмножеств из четырех объектов, топология связи между которыми в двух дендрограммах различна. Сравнение полученного значения QDist с распределением критических значений, полученных при сравнении выборки стохастических независимых дендрограмм, показало, что для двух дендрограмм, состоящих из 25 объектов, QDist = 0,51 соответствует 1% вероятности случайного характера связи между полученными кластерными решениями. Таким образом, использование

маркерных систем RAPD и ISSR для прогнозирования генетических связей между сортами льна показало высокую степень сходимости полученных результатов.

Изоморфность двух дендрограмм можно оценить, выделив в их структуре участок, характеризующийся максимально совпадающей топологией – MAST (Maximum agreement sub-tree). «Максимально согласованное суб-дерево» – MAST также может быть рассмотрено в качестве графической интерпретации уровня сходства дендрограмм (максимальное значение – общее число анализируемых образцов, минимальное – 3, так как топология любых двух дендрограмм совпадает в трех точках). Результирующее дерево MAST (рис. 3) содержит 11 точек совпадения топологии RAPD- и ISSR-дендрограмм, что относительно общего количества анализируемых сортов составляет 44%.

Заключение

Для исследования генетического разнообразия льна культурного использованы две системы мультилокусных доминантных маркеров – RAPD и ISSR. Показано, что, по сравнению с двенадцатью ISSR-маркерами, набор из восьми RAPD-праймеров более эффективен в выявлении полиморфизма коллекции льна масличного ($A_1 = 1,28$, $EMR = 6,74$ – для RAPD-ПЦР, $A_1 = 1,21$, $EMR = 5,74$ – для ISSR-ПЦР) и дифференциации генотипов льна ($MI = 0,74$ и $MI = 0,99$, ISSR и RAPD, соответственно). RAPD-праймеры амплифицируют боль-

шее количество локусов, с более высокими значениями параметров, описывающих выявляемый полиморфизм (PI_C , RP , n_c и др.), однако, согласно двустороннему t -критерию, выявленные различия средних статистически незначимы. Характеристики ДНК-спектров, генерируемых RAPD-праймерами – количество спектров на праймер (T_p), вероятность неопределенности (C_j), разрешающая способность (D_j), предел дискриминационной способности (DL) – значимо выше средних показателей для ISSR-спектров. Высокой эффективностью в выявлении полиморфизма дифференциации генотипов льна характеризуются ISSR-праймеры к тринуклеотидным микросателлитным повторам (ISSR 2 $PI_C = 0,22$, ISSR 18 $PI_C = 0,23$), что, вероятно, связано с высокой распространенностью тринуклеотидных мотивов в геноме льна. По данным Cloutier et al. [27], в геноме льна тандемные последовательности трех нуклеотидов составляют 54,6 и 68,7% от общего количества проанализированных BES-SSRs и EST-SSRs, соответственно. Повторы из двух нуклеотидов распространены реже (30,6 и 16,8% от BES-SSRs и EST-SSRs, соответственно), однако относительно более полиморфны.

UPGMA дендрограммы результатов RAPD- и ISSR-типирования хорошо соответствуют матрицам дистанций Жаккарда между генотипами льна ($r^k = 0,87$ и $r^k = 0,91$, соответственно). Согласно полученным данным ($QDist = 0,51$), маркерные системы RAPD и ISSR характеризуются высоким сходством прогнозируемых

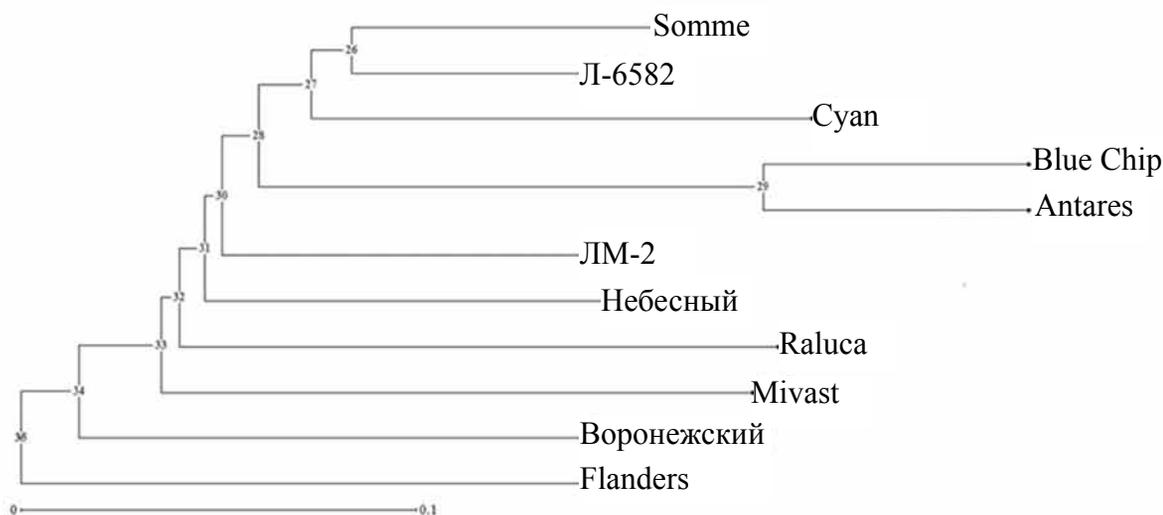


Рис. 3. MAST для дендрограмм, построенных на основе RAPD- и ISSR-анализов

генетических связей между сортами льна и низкой степенью расхождения топологии полученных кластерных деревьев, результирующее дерево MAST содержит 11 точек совпадения структуры RAPD- и ISSR-дендрограмм.

Таким образом, обе маркерные системы характеризуются высокой эффективностью выявления генетического разнообразия льна масличного, более выраженной в случае RAPD-ПЦР, высокая дискриминационная способность которой в отношении генотипов льна обусловлена уникальностью генерируемых ДНК-спектров. Генетические связи образцов льна, выявленные с использованием RAPD- и ISSR-маркеров, характеризуются высоким уровнем топологического сходства.

Список использованных источников

1. Cullis, C.A. Flax / C.A. Cullis // Genome mapping and molecular breeding in plants: Oilseeds; ed. K. Chittaranjan – Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. – Vol. 2 – P. 275–295.
2. Tammes, T. The genetics of the genus *Linum* / T. Tammes // Bibliographica Genetica. – 1928. – No. 4. – P. 1–36.
3. Shaw, F.J.K. Studies in Indian oilseeds. V The inheritance of characters in Indian linseed / F.J.K. Shaw, A.R. Khan, M. Alam / Ind. J. Agric. Sci. – 1931. – Vol. 1. – P. 1–57.
4. McGregor, W.G. Inheritance of quality and quantity of oil in flax in relation to other paint characters / W.G. McGregor // Can. J. Res. C. – 1937. – No. 15. – P. 362–379.
5. Flor, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rust / H.H. Flor // Adv. Gen. – 1956. – Vol. 8. – P. 29–54.
6. Comstock, V.E. Association among seed and agronomic characteristics in isogenic lines of flax / V.E. Comstock, J.H. Ford, B.H. Beard // Crop Sci. – 1963. – Vol. 3. – P. 171–172.
7. SSR-based linkage map of flax (*Linum usitatissimum* L.) and mapping of QTLs underlying fatty acid composition traits / S. Cloutier [et al.] // Mol. Breed. – 2011. – Vol. 28. – P. 437–451.
8. The genome of flax (*Linum usitatissimum* L.) assembled de novo from short shotgun sequence reads / Z. Wang [et al.] // Plant J. – 2012. – Vol. 72, No. 3. – P. 461–473.
9. Integrated consensus genetic and physical maps of flax (*Linum usitatissimum* L.) / S. Cloutier // Theor. Appl. Genet. – 2012. – Vol. 125, No. 8. – P. 1783–1795.
10. Association mapping of seed quality traits using the Canadian flax (*Linum usitatissimum* L.) core collection / B.J. Soto-Cerda // Theor. Appl. Genet. – 2014. – Vol. 127, No. 4. – P. 881–896.
11. National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
12. Diederichsen, A. Cultivated flax and the genus *Linum* L. Taxonomy and germplasm conservation / A. Diederichsen, K. Richards // Flax The genus *Linum*; ed. A.D. Muir, N.D. Westcott. – London: Taylor & Francis Ltd, 2003. – P. 23–33.
13. Хлесткина, Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4/2. – С. 1044–1054.
14. Perrier, X. Data analysis methods / X. Perrier, A. Flori, F. Bonnot // Genetic diversity of cultivated tropical plants; ed.: P. Hamon, et al. – Science Publishers, 2003. – P. 43–76.
15. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis / W. Powell [et al.] // Mol. Breed. – 1996. – Vol. 2. – P. 225–238.
16. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms / D. Bootstein [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1980. – Vol. 32. – P. 314–331.
17. Genetic mapping and variability of seven soybean sample sequence repeat loci / M. Morgante [et al.] // Genome. – 1994. – Vol. 37. – P. 763–769.
18. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. / C. Tessier [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1999. – Vol. 98. – P. 171–177.
19. T-REX: a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks / A. Boc [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2012. – Vol. 40 (W1). – P. W573–W579.
20. Finden, C.R. Obtaining common pruned trees / C.R. Finden, A.D. Gordon // Journal of Classification. – 1985. – № 2. – P. 255–276.
21. Computing the quartet distance between evolutionary trees / D. Bryant [et al.] // Proceedings of the Eleventh Annual ACM-SIAM Symposium on Discrete Algorithms. – N.Y.: ACM Press, 2000. – P. 285–286.

22. RAPD analysis of 54 North American flax cultivars / Y.-B. Fu [et al.] // Crop Science. – 2003. – Vol. 43. – P. 1510–1515.
23. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs / I. Pejic [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 97. – P. 1248–1255.
24. RAPD Analysis of 54 North American Flax Cultivars / Y.-B. Fu [et al.] // Crop Sci. – 2003. – Vol. 43, No. 4. – P. 1510–1115.
25. Fu, Y.-B. Effectiveness of bulking procedures in measuring population-pairwise similarity with dominant and codominant genetic markers / Y.-B. Fu // Theor. Appl. Genetic. – 2000. – Vol. 100, No. 8. – P. 1284–1289.
26. Лемеш, В.А. Молекулярные маркеры в изучении генетических ресурсов / В.А. Лемеш // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 94–104.
27. Simple sequence repeat marker development from bacterial artificial chromosome end sequences and expressed sequence tags of flax (*Linum usitatissimum* L.) / S. Cloutier [et al.] // Theor Appl Genet. – 2012. – Vol. 125, № 4. – P. 685–694.

Дата поступления статьи 10 августа 2015 г.

ПОЛИМОРФИЗМ ДЛИНЫ ИНТРОНОВ ГЕНОВ БЕТА-ТУБУЛИНА КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ (Обзорная статья)

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины
Украина, 04123, г. Киев, ул. Осиповского, 2а

Введение

Развитие молекулярной биологии способствует появлению новых подходов к генетическим исследованиям организмов, переходу к новым технологиям анализа генома. Этот процесс обусловлен наличием информативных генетических маркеров, что позволяет создать новые тест-системы для анализа генетического полиморфизма как на уровне продуктов гена (белки, ферменты), так и на уровне генетического материала клетки (полиморфизм ДНК) [1, 2]. Молекулярные маркеры, основанные на полиморфизме длин фрагментов ДНК и белков, позволяют успешно решать целый ряд задач фундаментального и прикладного характера, в том числе изучать биоразнообразие, возможные механизмы эволюции, проводить картирование хромосом, а также используются для семеноводства, племенного дела и т.д. [1, 3].

Оценка генетического полиморфизма имеет большое значение для изучения динамики генетической структуры популяций и экологических отношений в природных и искусственных растительных сообществах. Сведения о генетических ресурсах имеют фундаментальное значение для разработки программ получения новых сортов и защиты диких видов растений. Понимание генетических основ дивергенции и адаптации популяций является одной из важнейших задач популяционной генетики, играя ключевую роль в оценке эволюционных процессов. Молекулярно-генетические маркеры позволяют идентифицировать отдельные гены, их блоки, которые контролируют адаптивные признаки в популяциях растений и животных, что радикально изменило подходы к оценке генетического разнообразия, паспортизации и классификации сортов, картированию и определению физической природы генов и генети-

ческого мониторинга в селекции и генетике культурных растений [3, 4, 5].

Важной задачей в исследовании генетического полиморфизма живых организмов является оптимальный подбор молекулярно-генетических маркеров для этих целей. Одним из наиболее доступных и быстрых способов обнаружить вариабельность генома является применение молекулярных методов, основанных на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующая оценка соответствующих полиморфизмов ДНК. Используемые маркеры должны обладать определенными свойствами и иметь определенные характеристики, в том числе: доступность фенотипических проявлений аллельных вариантов для идентификации, равномерность распределения в геноме, легкую выявляемость и воспроизводимость результатов, возможность автоматизации процесса и т.д. [3, 4, 5].

На данный момент уже разработано большое количество различных ДНК-маркеров, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки, некоторые из них используются только с определенной целью. Развитие маркерных систем направлено от оценки анонимных последовательностей (ISSR, RAPD) к определению полиморфизма целевых последовательностей генов. Кроме того, по мере накопления информации о структуре генома, постоянно продолжают поиски новых, более эффективных, удобных и дешевых маркерных систем для проведения генетического анализа.

ДНК-маркеры на основе ПЦР-реакции

На сегодняшний день существует большая группа маркеров, основанных на полиморфизме ДНК, включая следующие: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – полиморфизм длин рестрикционных фраг-

ментов), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats – минисателлиты или полиморфизм количества tandemных повторов; ДНК-фингерпринт), SSR (Simple Sequence Repeat – микросателлиты), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) существенно облегчает анализ и может быть реализовано в подавляющем большинстве современных методов. Большой интерес представляет группа STS (Sequence Tagged Site) ДНК-маркеров, основанных на известных геномных последовательностях. К ним относятся SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), полученные в результате секвенирования и подбора праймеров к одному из ампликонов RAPD-спектра; CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), аналогичные SCAR-маркерам, и имеющие дополнительный этап обработки рестриктазами, повышающий количество выявляемых полиморфизмов. Микросателлитные повторы являются основой для двух типов маркеров. Один связан с исследованием полиморфизма участков ДНК, находящихся между микросателлитными последовательностями ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), другой – с непосредственным исследованием полиморфизма микросателлитных последовательностей SSR (Simple Sequence Repeats). В обоих случаях для подбора праймеров необходимо знание специфических последовательностей, фланкирующих микросателлитные повторы. Первый метод генерирует большое количество локусов с использованием одной пары праймеров, второй является локус-специфичным. Сравнительно невысокое число и сложность анализа SSR-локусов в значительной степени компенсируются высокой вариабельностью, воспроизводимостью, простотой анализа и возможностью его частичной автоматизации [6, 7], что представляется весьма удобным для индивидуального генотипирования организмов. IRAP-анализ (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) – метод амплификации геномной ДНК между близкорасположенными последовательностями ретротранспозонов. Для генотипирования этих последовательностей используют специально сконструированные праймеры Paws. Полиморфизм в данном случае об-

условлен либо мутацией в участке связывания праймера, либо уникальным биологическим процессом – ретротранспозицией, происходящей в результате встраивания ретротранспозона в новый участок геномной ДНК без потери первоначального участка [5, 8]. Метод REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplification Polymorphism) аналогичен IRAP, однако наряду с праймерами к ретротранспозонам используются микросателлитные праймеры – двух-, трех- или четырехбазовые, например, (NN)n, (NNN)n или (NNNN)n, ввиду того, что микросателлиты могут выявить высокие показатели мутации, имеющие индивидуальное местоположение у различных генотипов [8, 9].

С другой стороны, в задачах классификации и филогенеза предпочтительнее использование функциональных последовательностей, которые в той или иной степени связаны со структурными или физиологическими отличиями организмов, чем нефункциональной ДНК [10, 11]. В зависимости от глубины филогенетического анализа, ординация таксонов и уровень разрешения могут убывать при использовании медленно эволюционирующих последовательностей генов и в тоже время искусственно завышаться при использовании быстро эволюционирующих последовательностей, например, SSR-маркеров, теряющих разрешающую способность на высоком таксономическом уровне [12]. Интроны являются умеренно эволюционирующими последовательностями и довольно успешно используются при создании маркерных систем для оценки генетического разнообразия. Обычно рассматриваемые как «мусорная» ДНК, и в этой связи, минимально отклоняющиеся от модели нейтральной эволюции Кимуры [13] интроны, в частности полиморфизмы их длины, оказались универсальными для широкого спектра организмов и удобными для генетического картирования, поскольку они непосредственно связаны с конкретными генами [14, 15, 16].

Одна из таких систем STS-маркеров основана на полиморфизме длин интронов генов β -тубулина (Tubulin-Based Polymorphism – TBP). Она имеет определенный набор преимуществ по сравнению с остальными маркерами, разработанными на основе полиморфизма интронов. В частности, высокая межвидовая гомология, основанная, с одной стороны, на значительном

консерватизме фланкирующих интрон участков экзонов β -тубулина, к которым подобраны праймеры, а с другой стороны на вырожденности праймеров [17]. Также это совмещается с относительным обилием в геноме генов β -тубулина. В отличие от интронов многих других генов интроны β -тубулинов, видимо, играют определенную регулируемую роль, поэтому их эволюция идет медленнее, чем у многих других последовательностей интронов [18–21]. Одним из преимуществ использования интронов генов β -тубулина в царстве растений является их кластерная структура с гомологичными последовательностями у каждого фланкирующего экзона. Это делает ТВР даже более эффективным для предварительной или ускоренной оценки генетического разнообразия, чем активно используемые AFLP- или SSR-полиморфизмы, для которых необходима значительная предварительная информация о структуре генома.

Принцип ТВР-метода. Генотипирование растений с помощью ТВР

Метод ТВР основан на наличии интрон-специфического ДНК-полиморфизма у растительных генов семейства β -тубулина [17]. Полипептиды β -тубулина являются ключевыми составляющими микротрубочек – внутриклеточных структур, участвующих в основных процессах деления и роста эукариотических клеток [22, 23]. В связи с ключевой ролью β -тубулина в жизни клетки их первичная аминокислотная последовательность довольно консервативна у всех эукариотических организмов. Каждый вид содержит определенное количество генов β -тубулина (изотипов), которые образуют семейство данных генов [24, 25, 26]. У растений почти все гены β -тубулина

имеют общую геномную организацию – два интрона, расположенные в четко фиксированных локусах в пределах кодирующих экзонов (исключение – гены β -тубулина у кукурузы (*ZeamTUB1*) и риса (*OryzaTUB2*) [17, 27], у которых присутствует только один (первый) интрон. Схематическое изображение генов β -тубулина растений и амплифицируемые зоны приведены на рис. 1. Экзоны генов, кодирующих β -тубулин, консервативны, в то время как интроны относятся к гипервариабельным участкам генов и могут иметь различную длину [28]. Подобранные к консервативным участкам экзонов (на границе с интронами) праймеры, можно с помощью полимеразной цепной реакции получить копии последовательностей, находящихся между ними, то есть, интронов. Полиморфизм наблюдается в том случае, когда длина интронов у сравниваемых образцов оказывается различной.

Первоначально особое внимание уделялось лишь только первому интрону гена β -тубулина, поскольку он присутствует у всех видов растений и начинается с 397 нуклеотида после стартового кодона ATG [17, 27]. Биоинформационный анализ экзон-интронной структуры генов β -тубулина у различных видов растений позволил разработать вырожденные праймеры: *TBPF1*: 5'-GARGCYGARAAYTGYGAYTG-3'; *TBPR1*: 5'-TCHGGRTAYTCTCHCKRAT-3', которые дают возможность во время проведения ПЦР синтезировать последовательности ДНК, включающие интроны генов β -тубулина [17]. Сам ТВР-метод (основанный на полиморфизме длины I-го интрона) был разработан для риса (запатентовано РСТ/IT99/00415), в даль-

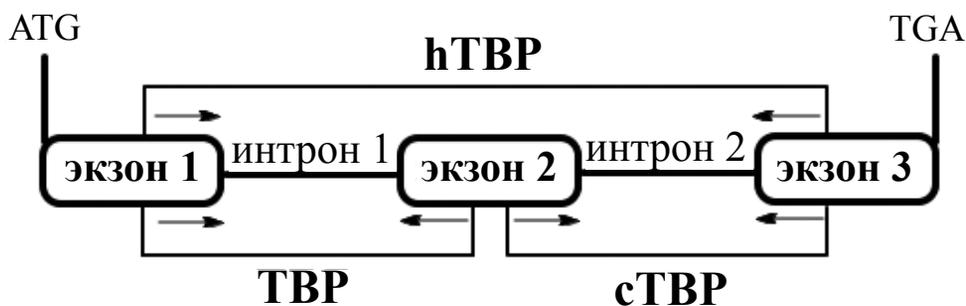


Рис. 1. Стрелки указывают положение и ориентацию праймеров в соответствующем методе. АТГ и ТГА указывают на старт и стоп-кодоны, соответственно. Квадратные скобки охватывают область амплификации с помощью методов ТВР, сТВР и hТВР

нейшем проверен и успешно применен для установления генетических связей внутри подвидов и разновидностей *Brassica* L., *Lotus* L., *Coffea* L. [17]. В базовом ТВР-методе для создания характерного электрофоретического профиля продукт ПЦР-реакции разделяется в неденатурирующем 6%-ном полиакриламидном геле [29] и визуализируется путем окрашивания геля нитратом серебра [30, 31]. Бэнды чаще всего регистрируют в бинарной системе: присутствующим присваивают значение единицы, отсутствующим – нуля. Размер ампликонов соответствующего бэнды определяют, используя ДНК-маркер.

В дальнейшем была предложена модификация ТВР-метода – сТВР (combinatorial ТВР) [32], который опирается на полиморфизм длины I-го интрона генов β -тубулина и сочетает в себе данные как о полиморфизме длины первого, так и второго интронов. При этом используются следующие две пары праймеров: *TBPfex1*: 5'-AACTGGGCBAARGGNCAYTAYAC-3' и *TBPprex1*: 5'-ACCATRCAYTCRTCDGCRTTYTC-3' (фланкируют границы первого интрона генов тубулина); *TBPfin2*: 5'-GARAAYGCHGAYGARTGYATG-3' и *TBPPrin2*: 5'-CRAAVCCBACCATGAARAARTG-3' (фланкируют второй интрон) [32]. Метод сТВР (анализ I-го и II-го интронов) использовался для оценки видов и с ортов *Rosa* L., *Eleusine* Gaertn., *Arachis* L., *Camelina* Crantz, *Phaseolus vulgaris* L. и целого ряда диких травянистых растений [28, 32, 33]. В 2011 году была предложена новая модификация ТВР, названная hТВР (horse ТВР) [34], основанная на одновременной амплификации обоих интронов и экзона, лежащего между ними. Используется всего лишь одна пара вырожденных праймеров: *TBP-F*:

5'-AACTGGGCBAARGGNCAYTAYAC-3' и *TBP-R*: 5'-CRAAVCCBACCATGAARAARTG-3' [28]. Данный метод был использован для характеристики представителей рода *Camelina* [34].

В последнее время авторы метода предлагают использовать для разделения полученных фрагментов капиллярный электрофорез (СЕ-ТВР), который позволяет получать более точные и легче воспроизводимые данные [33, 35, 36]. Ведутся разработки по применению ТВР для идентификации видов, являющихся компонентами сложных коммерческих растительных смесей. Это может быть использовано в анализе пищи при установлении состава продуктов питания растительного происхождения, выявлении различных аллелергенов, возбудителей болезней, продуцентов токсинов и т.д. Уже проанализированы растительные смеси, содержащие пшеницу, ячмень, сою, кукурузу, люцерну и подсолнечник [35, 37, 38].

Таким образом, на данный момент с использованием различных ТВР-маркеров исследованы представители 11 семейств высших растений (см. табл.). В то время как исследования Бревиарио с коллегами сосредоточены на двудольных травянистых растениях, нами была сделана оценка применимости ТВР для злаков и древесных растений. Так, с помощью ТВР-метода удалось выявить межсортовой полиморфизм у *Hordeum vulgare* L. и *Triticum aestivum* L., а также обнаружить внутривидовой полиморфизм различных популяций *Aegilops biuncialis* Vis. (по ТВР/hТВР-маркерам). ТВР-метод был успешно апробирован на отечественных сортах *Camelina sativa* (L.) Crantz, *Eleusine coracana* Gaertn. и *Eleusine indica* (L.) Gaertn.

Список видов растений, проанализированных с помощью ТВР-метода

№	Вид растения	Тип интронов [анализируемые диапазоны]	Литературный источник
Покрытосеменные, двудольные			
Капустные (Brassicaceae)			
1.	<i>Brassica napus</i> L.	I-интрон [205–275 п.н.], I-интрон и II-интрон (сТВР) [I: 300–600 п.н., II: 500–1000 п.н.], I-интрон (ТВР) [300– 2000 п.н.], СЕ-ТВР [360–950 п.н.]	[17, 27, 35]
2.	<i>Camelina</i> Crantz	I-интрон + II-интрон (h-ТВР) [600–2000 п.н.], II-интрон (сТВР) [300–880 п.н.], I-интрон (ТВР) [300–4000 п.н.]	[33, 34]

Продолжение таблицы

№	Вид растения	Тип интронов [анализируемые диапазоны]	Литературный источник
Бобовые (Fabaceae)			
3.	<i>Lotus</i> L.	I-интрон (ТВР), I-интрон и II-интрон (сТВР) [205–275 п.н.]	[17, 32]
4.	<i>Trifolium</i> L.	I-интрон и II-интрон (сТВР) [300–1500 п.н.]	[32]
5.	<i>Glycine</i> L.	I-интрон (ТВР), I-интрон СЕ-ТВР [305–1110 п.н.]	[35]
6.	<i>Medicago</i> L.	I-интрон (ТВР) [300–2000 п.н.], I-интрон СЕ-ТВР [650–1000 п.н.]	[35]
7.	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	I-интрон и II-интрон (сТВР) [I: 300–2000 п.н., II: 200–1500 п.н.]	[28]
Мареновые (Rubiaceae)			
8.	<i>Coffea</i> L.	I-интрон (ТВР) [587–1000 п.н.]	[17]
Розоцветные (Rosaceae)			
9.	<i>Rosa</i> spp.	I-интрон и II-интрон (сТВР) [I: 4000–1500 п.н., II: 300–1200 п.н.]	[32]
Астровые (Asteraceae)			
10.	<i>Crepis</i> spp.	I-интрон (ТВР/сТВР) [330–1500 п.н.]	[32]
11.	<i>Helianthus</i> L.	I-интрон (ТВР) [360–1020 п.н.], I-интрон СЕ-ТВР [370–2000 п.н.]	[35]
12.	<i>Achillea</i> L.	I-интрон (ТВР) [100–1200 п.н.]	[39]
Гречишные (Polygonaceae)			
13.	<i>Rumex acetosa</i> L.	I-интрон (ТВР/сТВР) [330–1500 п.н.]	[32]
Подорожниковые (Plantaginaceae)			
14.	<i>Veronica persica</i> Poiret.	I-интрон (ТВР/сТВР) [330–1500 п.н.]	[32]
15.	<i>Plantago lanceolata</i> L.	I-интрон (ТВР/сТВР) [330–1500 п.н.]	[32]
Страстоцветные (Passifloraceae)			
16.	<i>Passiflora</i> L.	I-интрон (ТВР), I-интрон СЕ-ТВР [380–1500 п.н.]	[36]
Льновые (Linaceae)			
17.	<i>Linum usitatissimum</i> L.	I-интрон (ТВР) [400–3000 п.н.]	[*]
Буковые (Fagaceae)			
18.	<i>Quercus</i> L.	I-интрон (ТВР) [200–2000 п.н.]	[*]
Покрывосеменные, однодольные			
Злаки (Poaceae)			
19.	<i>Eleusine</i> Gaertn.	I-интрон и II-интрон (сТВР) [I: 300–1500 п.н., II: 200–1500 п.н.], I-интрон (ТВР) [200–2000 п.н.]	[27, *]
20.	<i>Arachis</i> L.	I-интрон и II-интрон (сТВР) [I: 300–1500 п.н., II: 200–1500 п.н.]	[27]
21.	<i>Oryza</i> L.	I-интрон и II-интрон (сТВР)	[28]
22.	<i>Nardus stricta</i> L.	I-интрон (ТВР/сТВР) [300–1500 п.н.]	[32]
23.	<i>Phleum pratense</i> L.	I-интрон (ТВР/сТВР) [300–1500 п.н.]	[32]
24.	<i>Festuca violacea</i> Gaudin.	I-интрон (ТВР/сТВР) [300–1500 п.н.]	[32]
25.	<i>Deschampsia cespitosa</i> (L.) P. Beauv.	I-интрон (ТВР/сТВР) [300–1500 п.н.]	[32]
26.	<i>Bromus hordaceus</i> L.	I-интрон (ТВР/сТВР) [300–1500 п.н.]	[32]

Окончание таблицы

№	Вид растения	Тип интронов [анализируемые диапазоны]	Литературный источник
Злаки (<i>Poaceae</i>)			
27.	<i>Poa</i> L.	I-интрон (ТВР/сТВР) [330–1500 п.н.]	[32]
28.	<i>Arrhenatherum</i> P. Beauv.	I-интрон (ТВР/сТВР) [330–1500 п.н.]	[32]
29.	<i>Holcus lanatus</i> L.	I-интрон (ТВР/сТВР) [330–1500 п.н.]	[32]
30.	<i>Phalaris arundinacea</i> L.	I-интрон (ТВР/сТВР) [330–1500 п.н.]	[32]
31.	<i>Dactylis glomerata</i> L.	I-интрон (ТВР/сТВР) [330–1500 п.н.]	[32]
32.	<i>Triticum</i> L.	I-интрон (ТВР) [300–2000 п.н.], I-интрон СЕ-ТВР [350–840 п.н.], I-интрон (ТВР) [300–2000 п.н.]	[35, 40]
33.	<i>Zea</i> L.	I-интрон (ТВР) [300–2000 п.н.], I-интрон СЕ-ТВР [550–1020 п.н.]	[35]
34.	<i>Hordeum</i> L.	I-интрон (ТВР) [300–2000 п.н.], I-интрон СЕ-ТВР [400–900 п.н.]	[35, 40]
35.	<i>Aegilops</i> L.	I-интрон (ТВР), I-интрон + II-интрон (h-ТВР) [300–4000 п.н.]	[41]

* – результаты приведены в данной статье

Нами был проведен ТВР-анализ перспективных масличных сортообразцов *S. sativa* из коллекции Национального ботанического сада им. Н.Н. Гришко НАН Украины: сортов Перемога, Клондайк, Мираж, Евро-12, а также селекционных линий ЕОРЖЯФ-1, ЕОРЖЯФ-2, ЕОРЖЯФ-3, ЕОРЖЯФ-4, ЕОРЖЯФ-5, ЕОРЖЯФЧ, ЕОРЖЯФЧП и ЕОРЖЯФД. Из полученной электрофореграммы (рис. 2 а) видно, что все ампликоны – участки интронов β-тубулина – имеют длину в диапазоне от 295 до 3200 пар нуклеотидов (п.н.). Примечательным является то, что у *S. sativa* образуется большое количество продуктов амплификации (около 50) и все они четко различимы на электрофореграмме. Значительная часть зон являются мономорфными – представленными единственным ампликоном. В целом можно выделить 7 четких полиморфных зон, расположенных в диапазонах 295–300 п.н., 350–400 п.н., 600–700 п.н., 1000–1100 п.н. Например, для сортообразцов ЕОРЖЯФ-3 и Евро-12 характерно наличие фрагментов размером 295 п.н., а для ЕОРЖЯФ-5 и ЕОРЖЯФЧП – 370 п.н. (у остальных образцов образуются фрагменты длиной 375 п.н.). У 4 из 12 сортообразцов наблюдается фрагмент 660 п.н. (Мираж, ЕОРЖЯФ-1, ЕОРЖЯФ-5, ЕОРЖЯФЧП), у остальных восьми – 650 п.н. Ампликон размером 1085 п.н.

обнаружен только у образца ЕОРЖЯФЧ. Таким образом, например, сортообразец ЕОРЖЯФЧ отличается от других наличием ампликонов 660 п.н., 1085 п.н. и отсутствием – 295 п.н., 375 п.н., 650 п.н. и 1110 п.н.

ТВР-метод также продемонстрировал дифференцирующую способность при исследовании представителей рода *Eleusine* Gaertn. Было исследовано 2 сорта *E. coracana* украинской селекции (Тропиканка и Евгения), два соматоклональных варианта SE-1 и SE-4, полученные из сорта Тропиканка, 2 генотипа *E. indica* (4А-2-1, 4А-1) и природная популяция *E. indica*. При этом, хотя часть ампликонов является одинаковой для всех образцов, возможно, являясь специфичными для рода *Eleusine*, различия легко заметны как между разными видами, так и между генотипами в пределах одного вида. Результаты электрофоретического анализа (рис. 2 б) свидетельствуют о том, что во время амплификации образуются продукты длиной от 100 до 4440 п.н. Однако более четкие зоны располагаются в диапазоне от 370 до 4440 п.н. Различия между двумя видами заключаются в том, что у *E. coracana* чаще наблюдаются ампликоны 1440 п.н., 855 п.н., 1190 п.н., а у *E. indica* – 1410 п.н., 830 п.н., 980 п.н. Кроме того, ампликон 450 п.н. присутствует у всех образцов *E. indica*, а у *E. coracana* – только у сорта Евгения и соматоклонального варианта

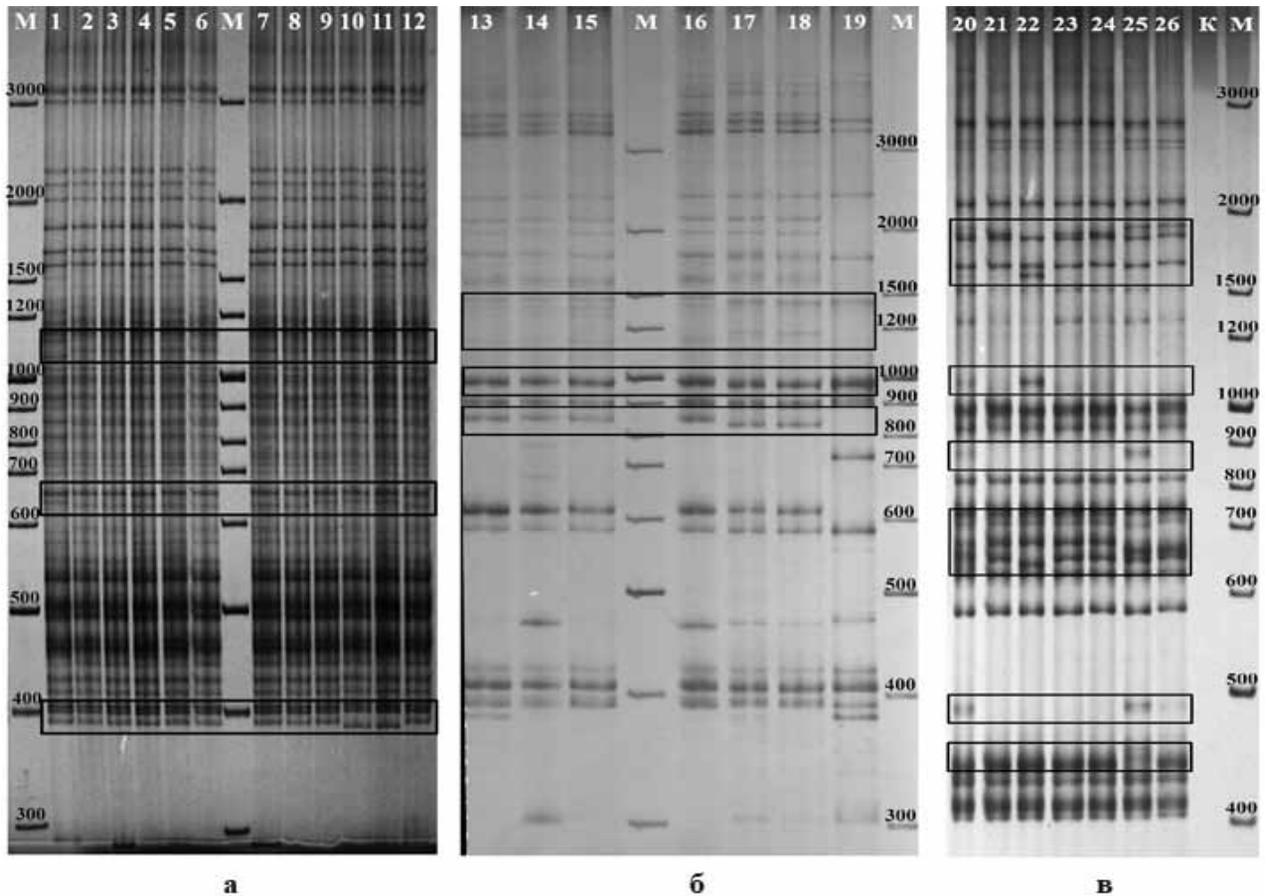


Рис. 2. Электрофореграмма с ампликонами интронов генов β -тубулина: а – *C. sativa*; б – *Eleusine*; в – *L. usitatissimum*. Прямоугольниками отмечены полиморфные зоны; М – маркер; К – контроль;

1–15 (в верхней части рисунка) – номера образцов.

- а – 1–12: сорта и сортообразцы *C. sativa*: Мираж, ЕОРЖЯФ-2, ЕОРЖЯФ-3, Евро-12, ЕОРЖЯФ-4, Перемога, Клондайк, ЕОРЖЯФЧ, ЕОРЖЯФ-1, ЕОРЖЯФ-5, ЕОРЖЯФЧП, ЕОРЖЯФД;
 б – 13–16: *E. coracana* (сорт Тропиканка, соматональный вариант SE-1, соматональный вариант SE-4, сорт Евгения), 17–18: *E. indica* (4А-2-1, 4А-1), 19 – природная популяция *E. indica*;
 в – 20–26: сорта *L. usitatissimum*: Хейя-15, Хейя-13, Светоч, Свитанок, Антей, Zenga, Глазур

SE-1. Как ни странно, наибольшие отличия обнаружены для природной популяции *E. indica* – у нее отсутствует целый ряд ампликонов, ранее выявленных у вида *E. indica*: 610 п.н., 830 п.н., 980 п.н., 1575 п.н., 2130 п.н., 2370 п.н., 3640 п.н.; и имеются уникальные – 370 п.н., 540 п.н., 735 п.н. Таким образом, для дифференциации растений рода *Eleusine* оказалось достаточным использование лишь I-го интрона гена β -тубулина.

Впервые проведенный нами ТВР-анализ нескольких сортов *L. usitatissimum* (рис. 2 в) показал, что амплифицируемые фрагменты находятся в диапазоне от 405 п.н. до 2820 п.н. Всего наблюдается 31 четкая зона, 16 из которых являются полиморфными. Ампликоны визуализируются в следующих диапазонах:

435–480 п.н., 665–730 п.н., 880–885 п.н., 1105 п.н., 1595–1895 п.н. Все изученные образцы имеют довольно четкий ТВР-профиль, по которому их можно дифференцировать друг от друга, что позволяет использовать этот метод в селекционной работе *L. usitatissimum*.

Вместе с тем, ТВР может быть использован в качестве источника генетических маркеров и при изучении древесных растений [39]. Лесное хозяйство является вторым по экономической значимости после сельского хозяйства возобновляемым биологическим ресурсом Украины. Если в решении биотехнологических и селекционных вопросов сельскохозяйственного производства уже давно применяются молекулярно-генетические маркеры, то в лесоведении они используются не так интенсивно.

Молекулярные маркеры позволяют картировать гены количественных признаков у ряда видов древесных растений. Такие исследования проводятся в первую очередь в отношении признаков, которые имеют значительный экономический интерес, а именно – скорость роста, качество древесины, устойчивость к экстремальным условиям среды, заболеваниям и вредителям. Это важное, значительно развитое в западных странах направление популяционной генетики лесообразующих древесных растений совсем не используется в Украине. Как свидетельствует мировой научный опыт, определение генетического полиморфизма аборигенных видов древесных растений, их популяционно-генетической структуры, ее воспроизведения в семенном потомстве и система скрещивания – только начальный уровень для получения информации о распределении адаптивной изменчивости сложных признаков на микро- и макроэволюционных уровнях.

В связи с этим была исследована применимость ТВР-метода для некоторых видов древесных растений, а именно: *Quercus robur* L., *Fagus sylvatica* L., *Ulmus laevis* L., *Betula pendula* L., *Acer platanoides* L., *Picea abies* (L.) Н. Karst., *Pinus sylvestris*. Установлено, что по полиморфизму длины только первого интрона гена β-тубулина у *Q. robur* отличаются растения внутри одной популяции. Размеры ампликонов варьируют в пределах от 295 п.н. до 1820 п.н. Для *Fagus* L. и *Pinus* L. диапазон варьирования ампликонов составляет 300–3500 п.н. и 300–3000 п.н., соответственно.

В целом, на сегодняшний день несколько лабораторий успешно используют семейство генов β-тубулина для оценки генетического разнообразия и эволюционных исследований среди эукариотических видов. Все они охарактеризовали ТВР метод как доступный инструмент для генетического анализа и селекционной работы.

Заключение

Опубликованные на данный момент результаты ТВР-анализа у растений свидетельствуют о том, что данный метод, основанный на изучении полиморфизма длины интронов генов β-тубулина, является удобным и надежным подходом, применимым для ши-

рокого спектра видов растений. Он может быть использован для характеристики меж- и внутривидового разнообразия, а также для построения генетических карт, поскольку непосредственно отражает вариации, происходящие внутри генов. Метод применим в молекулярно-филогенетическом анализе, для предварительной характеристики и распознавания различных сортов растений, быстрого фингерпринтинга популяций. Этот инструмент имеет хорошие перспективы в селекционных исследованиях, направленных на улучшение агрономических и биохимических признаков сельскохозяйственных культур. В целом метод, основанный на оценке полиморфизма длины интронов генов β-тубулина (ТВР), является быстрым, недорогим, простым и надежным, и практически не требует наличия предварительных сведений о геноме растений, но вместе с тем является обильным источником генетической информации.

Список использованных источников

1. Schulman, A.H. Molecular markers to assess genetic diversity / A.H. Schulman // *Euphytica*. – 2007. – Vol. 158. – P. 313–321.
2. Хавкин, Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур / Э.Е. Хавкин // *Сельскохозяйственная биология*. – 2003. – № 3. – С. 26–41.
3. Конарев, А.В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений / А.В. Конарев // *Сельскохозяйственная биология*. – 1998. – № 5. – С. 3–25.
4. Генотипирование сортов яблони российской селекции с использованием микросателлитных маркеров / И. И. Супрун [и др.] // *Известия ТСХА*. – 2011. – № 6. – С. 162–166.
5. Календарь, Р.Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р.Н. Календарь, В.И. Глазко // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2002. – Т. 34. – № 4. – С. 279–296.
6. Dzialuk, A.B. PCR-multiplex of six chloroplast microsatellites for population studies and genetic typing in *Pinus sylvestris* / A.B. Dzialuk, J. Burchyk // *Silvae Genet.* – 2004. – Vol. 53. – № 5–6. – P. 246–248.

7. Diwan, N. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean / N. Diwan, P.B. Cregan // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – Vol. 95. – P. 723–733.
8. Kalendar, R. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting / R. Kalendar, A.H. Schulman // *Nature Protocols.* – 2006. – Vol. 1. – № 5. – P. 2478–2484.
9. Харченко, П.Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии / П.Н. Харченко, В.И. Глазко // Москва: Воскресенье. – 2006. – 480 с.
10. Rafalski, J.A. RFLP map of soybean (*Glycine max*) 2N = 40. In: *Genetic Maps* (O'Brien, S.J., ed.) / J.A. Rafalski, S.V. Tingey // Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. – 1993. – P. 149–156.
11. Koeber, R.M.D. Contributions of DNA molecular marker technologies to the genetics and breeding of wheat and barley / R.M.D. Koeber, W. Powell, P. Donini // *Plant Breed. Rev.* – 2001. – Vol. 21. – P. 181–220.
12. Yang, Z. Comparison of models for nucleotide substitution used in maximum likelihood phylogenetic estimation / Z. Yang, N. Goldman, A. Friday // *Mol. Biol. Evol.* – 1994. – № 11. – Vol. 3. – P. 16–324.
13. Kimura, M. The neutral theory of molecular evolution / M. Kimura // Cambridge University Press, Cambridge. – 1983. – 332 p.
14. Morello, L. Plant spliceosomal introns: not only cut and paste / L. Morello, D. Breviario // *Curr. Genomics.* – 2008. – Vol. 9. – P. 227–238.
15. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. / L.H. Herve [et al.] // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – № 28. – Vol. 4. – P. 215–220.
16. Breviario, D. Plant tubulin genes: Regulatory and evolutionary aspects [monograph on the internet] / D. Breviario // In *Plant Microtubules* (P. Nick, Ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2008. – P. 207–232.
17. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species / M. Bardini [et al.] // *Genome.* – 2004. – Vol. 47. – P. 281–291.
18. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron / J.S. Jeon [et al.] // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 123. – P. 1005–1014.
19. A long leader intron of the *OsTub16* rice beta-tubulin gene is required for high level gene expression and can autonomously promote transcription both *in vivo* and *in vitro* / L. Morello [et al.] // *Plant J.* – 2002. – Vol. 29. – P. 33–44.
20. Introns are key regulatory elements of rice tubulin expression / E. Fiume [et al.] // *Planta.* – 2004. – Vol. 218. – P. 693–703.
21. Breviario, D. Multiple tubulins: evolutionary aspects and biological implications / D. Breviario, S. Gian, L. Morello // *Plant J.* – 2013. – Vol. 75. – P. 202–218.
22. Peter, N. Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants / N. Peter // *Int. Rev. Cytol.* – 1998. – Vol. 184. – P. 33–80.
23. Nogales, E. Structural insights in to microtubule function / E. Nogales // *Annu. Rev. Biochem.* – 2000. – Vol. 69. – P. 277–302.
24. McKean, P.G. The extended tubulin superfamily / P.G. McKean, S. Vaughan, K. Gull // *J. Cell Sci.* – 2001. – Vol. 114. – P. 2723–2733.
25. Liaud, M.-F. The β -tubulin gene family of pea: primary structures, genomic organization and intron-dependent evolution of genes / M.-F. Liaud, H. Brinkmann, R. Cerff // *Plant Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 18. – P. 639–651.
26. Luduena, R.F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications / R.F. Luduena // *Int. Rev. Cytol.* – 1998. – Vol. 178. – P. 207–275.
27. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined beta-tubulin introns / D. Breviario [et al.] // *Mol. Breed.* – 2007. – 20. – P. 249–259.
28. Plant tubulin intronics / D. Breviario [et al.] // *Cell Biol. Int.* – 2008. – Vol. 32. – P. 571–573.
29. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / J. Sambrook, W.R. David // Cold Spring Harbor. – 2001. – Vol. 2. – 763 p.
30. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silverstaining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels / H. Benbouza [et al.] // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2006. – № 10. – Vol. 2. – P. 77–81.
31. Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR stains / M.H. Rahman [et al.] // *Plant Mol. Biol. Reporter.* – 2000. – Vol. 18. – P. 339–348.
32. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted

to well defined experimental needs / L. Braglia [et al.] // *Diversity*. – 2010. – № 2. – P. 572–585.

33. Genomic fingerprinting of *Camelina* species using cTBP as molecular marker [Электронный ресурс] / I. Galasso [et al.] // *Amer. J. Plant Sci.* – 2015. – Режим доступа: <http://www.scirp.org/journal/ajps>; <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.68122>. – Дата доступа: 20.05.2015.

34. h-TBP: an approach based on intron-length polymorphism for the rapid isolation and characterization of the multiple members of the β -tubulin gene family in *Camelina sativa* (L.) Crantz / I. Galasso [et al.] // *Mol. Breeding*. – 2010. – Vol. 28. – P. 635–645.

35. Technical improvement of the TBP (tubulin-based polymorphism) method for plant species detection, based on capillary electrophoresis / F. Gavazzi [et al.] // *Electrophoresis*. – 2012. – Vol. 33. – P. 2840–2851.

36. TBP-assisted species and hybrid identification in the genus *Passiflora* / L. Braglia [et al.] // *Mol. Breed.* – 2014. – Vol. 33. – P. 209–219.

37. A multiplex, bead-based array for profiling plant-derived components in complex food matrixes / E. Ponzoni [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – Vol. 405. – P. 9849–9858.

38. Traceback identification of plant components in commercial compound feed through an oligonucleotide microarray based on tubulin intron polymorphism / E. Ponzoni [et al.] // *Food Chem.* – 2014. – Vol. 162. – P. 72–80.

39. Пірко, Я.В. Дослідження генетичної мінливості різних видів рослин за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну / Я.В. Пірко // *Промышленная ботаника*. – 2011. – № 11. – С. 152–156.

40. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліна у сортів *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L. / А.М. Рабокoнь [та ін.] // *Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць*. – К.: Логос, 2015. – Т. 17. – С. 82–86.

41. Intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. / A. Rabokon [et al.] // *The Open Plant Sci. J.* – 2015. (*in press*).

Дата поступления статьи 18 августа 2015 г.

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ *TaCwi-A1* ЛОКУСА В КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ И ЛИНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

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

²Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию

Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Введение

Пшеница является одним из главных пищевых злаков, культивируемых в мире. В связи с увеличением населения Земли, а, следовательно, и потребностей в данном злаке, одной из главных задач для селекционеров является повышение урожайности зерна пшеницы. Для Республики Беларусь, где обеспечение народного хозяйства зерном пшеницы собственного производства является важнейшей государственной задачей, возделывание сортов с высокими показателями урожайности имеет приоритетное значение. Урожайность зерна тесно связана с такими характеристиками, как количество зерен на единицу площади и их масса [1]. По данным Collaku [2], урожайность зерна на 20% зависит от массы тысячи зерен. В ряде стран, таких как Индия и Китай, данный показатель является основным для принятия того или иного сорта для возделывания фермерами. Например, в климатических условиях Китая при увеличении массы тысячи зерен всего лишь на 1 грамм можно добиться увеличения урожайности на 140–160 кг/га [3, 4].

На сегодняшний день известно большое количество локусов, контролирующих урожайность зерна. В частности, локусы, отвечающие за массу зерна, были картированы почти на каждой из 21 хромосом [5–7]. *Su* с соавторами [5], например, было выявлено восемь локусов, контролирующих массу семян в главном колосе и расположенных на хромосомах 2A, 2D, 4B, 5A, 7A и 7B. Данные локусы объясняют от 5,6 до 16,2% фенотипических вариаций данного признака. Помимо этого данными авторами были выявлены локусы, оказывающие влияние на массу тысячи зерен и расположенные на хромосомах 1D, 2A, 5D и 6A. Вклад

данных локусов в фенотипическое проявление признака в зависимости от условий окружающей среды составляет от 5,9 до 20,1% [8].

Значительная роль в формировании урожайности отводится инвертазе клеточной стенки (Cell wall invertase – *Cwi*). Ее важность в развитии тканей нефотосинтезирующих органов пшеницы [9, 10], распределении углерода [11] и ее влияние на массу зерна [12–14] подтверждена многочисленными исследованиями. У большинства растений углерод, ассимилированный в форме сахаров, в частности, сахарозы, транспортируется из фотосинтезирующих в нефотосинтезирующие ткани, где сахароза может быть использована напрямую или расщеплена сахароза-синтазой либо инвертазой до гексоз [15]. Инвертаза относится к классу гидролаз и катализирует расщепление сахарозы до глюкозы и фруктозы. В зависимости от растворимости, рН-оптимума и локализации в клетке, инвертазы высших растений подразделяют на три типа: цитоплазматические, вакуолярные и инвертазы клеточной стенки [16]. Инвертаза клеточной стенки имеет кислый рН-оптимум, связана с клеточной стенкой ионными связями и катализирует гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы [9].

По данным Weber с соавторами [17], количество инвертазы клеточной стенки в оболочке семян имеет высокую степень корреляции с уровнем содержания гексоз в семядолях и апопласте эндосперма, что, в свою очередь, оказывает влияние на развитие нефотосинтезирующих тканей семян. Трансгенная антисмысловая репрессия гена, кодирующего инвертазу клеточной стенки моркови, приводит к укорочению стержневого корня и к увеличению соотношения сухой массы листьев к массе корней [11].

Снижение массы семян до 70% было показано на мутантном сорте кукурузы *Miniature-1*, лишенном активности инвертазы клеточной стенки [12, 13]. Hirose с соавторами [18] выявили, что экспрессия гена *OsCINI* связана с активностью инвертазы клеточной стенки и развитием зерновки, что дает основание предполагать, что экспрессия данного гена играет важную роль в обеспечении зерновок источником углерода. Ген риса *GIF1* кодирует инвертазу клеточной стенки, необходимую для распределения углерода на ранних стадиях созревания [14].

Нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующая инвертазу клеточной стенки, впервые была клонирована у моркови [19], а затем охарактеризована и описана у ряда таких растений, как томат [20], соя [21], кукуруза [13], сорго [22] и рис [18]. Общей чертой всех аминокислотных последовательностей инвертазы клеточной стенки является наличие β-фруктозидазного мотива (NDPNG/A) и аминокислотного остатка цистеина [9]. Гены, кодирующие инвертазу клеточной стенки, имеют сходную структуру и состоят из 6–8 экзонов [23] и большинство из них имеет очень короткий второй экзон, кодирующий только три аминокислоты (DPN) [9]. Полиморфизм этих генов в геноме пшеницы вносит существенный вклад в показатель массы тысячи зерен [3]. В связи с этим характеристика локуса, кодирующего инвертазу клеточной стенки, с привлечением функциональных маркеров является важным этапом в маркероопосредованной селекции пшеницы.

Целью данной работы было исследование аллельного разнообразия локуса *TaCwi-1* и выявление ассоциации между его аллелями и массой тысячи зерен в сортах и линиях пшеницы, используемых в белорусской селекции.

Материалы и методы

Аллельное разнообразие локуса *TaCwi-1* было исследовано в коллекции из 79 сортов и линий озимой пшеницы, используемых в селекционном процессе РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино). Измерения массы тысячи зерен были проведены в лаборатории озимой пшеницы данного учреждения.

ДНК из зерен выделяли по методу, предложенному Plaschke и др. [24]. Выделение проводили из двух зерновок для каждого сорта.

Анализ аллельного состава гена *TaCwi-1* проводили согласно методике Ма и др. [3] с изменениями.

Для амплификации была использована следующая программа: 1 цикл продолжительностью 5 мин при 94 °С; 35 циклов, включающих в себя: 45 с при 94 °С, 45 с при 57 °С, 1 мин 30 с при 72 °С, заключительная элонгация – 10 мин при 72 °С.

Состав реакционной смеси для амплификации объемом 12,5 мкл был следующий: 1×буфер для *Taq* полимеразы «А» без $MgCl_2$; 1,5 мМ $MgCl_2$; 0,2 мМ НТФ; 0,25 нМ праймеры; 0,5 ЕА *Taq*-полимераза; 50 нг ДНК. Для анализа использовали праймеры и ПЦР-реактивы производства компании Праймтех (Беларусь).

Визуализацию фрагментов амплификации проводили после разделения методом электрофореза в трис-ацетатном буфере при помощи системы документирования гелей GelDoc 2000.

Результаты и обсуждение

Для изучения ассоциации между массой тысячи зерен и аллельным разнообразием локуса *TaCwi-1* были протестированы 79 сортов и линий озимой пшеницы, представляющих интерес для селекционного процесса. Образцы сорта Элегия были взяты в качестве стандарта. В среднем масса тысячи зерен, взятых для анализа сортов, составила 51,4 г. Для тестирования аллелей гена *TaCwi-1* был изучен однонуклеотидный полиморфизм в 4-м интроне (позиция 2,727 нп) с помощью пары комлементарных доминантных функциональных маркеров CW121 и CW122. ПЦР-фрагмент размером 404 п.н. (аллель «мутантного типа» *TaCwi-1b*) амплифицировался у образцов, имеющих мутацию в 4-м интроне (АТ→АГ), приводящую к изменению транскрипции в пятом экзоне и появлению пептида с другой структурой, снижающей массу тысячи зерен. ПЦР-фрагмент размером 402 п.н. амплифицировался у образцов, не имеющих описанной выше мутации (аллель «дикого» типа *TaCwi-1a*) [3]. Пример электрофоретического разделения данных фрагментов гена *TaCwi-1*, амплифицированных с использованием праймеров CW121 и CW122 из генома некоторых сортов пшеницы, показан на рисунке. Результаты измерения массы тысячи зерен и аллельный состав гена *TaCwi-1* исследованных сортов пшеницы приведены в таблице.

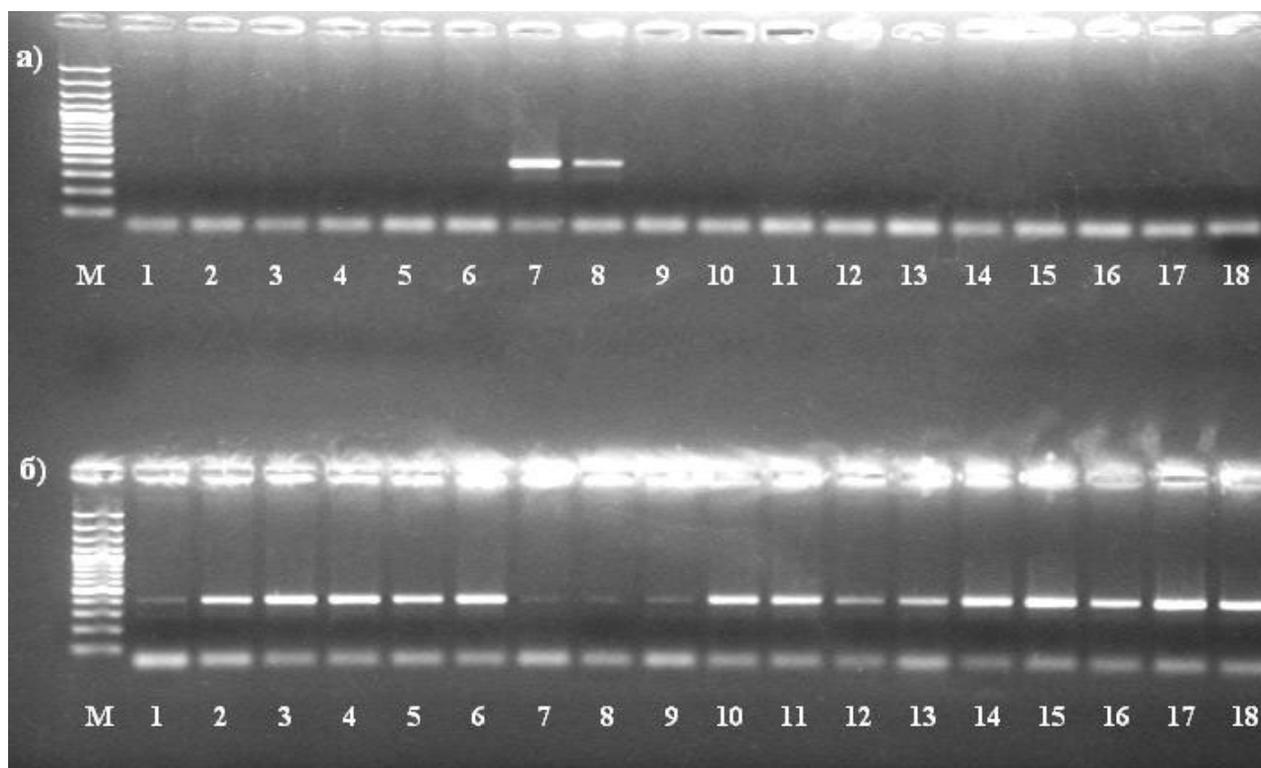


Рисунок. Результаты разделения методом электрофореза ампликонов локусов CW: а – маркер CW121, б – маркер CW122. Маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (M). Сорта: Хоревия (1–2), Юнона (3–4), Фауг (5–6), Balaton (7–8), Miranda (9–10), Хвост (11–12), Благодарна (13–14), Доброчын (15–16), Заграва одесская (17–18)

Масса тысячи зерен и аллельный состав гена *TaCwi-A1* сортов и линий пшеницы

№	Название сорта, линии	Страна происхождения	Масса тысячи зерен, г	Аллель
1	Элегия (образец 1)	Беларусь	52,9	<i>TaCwi-A1a</i>
2	Элегия (образец 2)	-/-	53,1	-/-
3	Альбатрос одесский	Украина	48,0	-/-
4	Багира	-/-	52,1	-/-
5	Барвина	-/-	55,2	-/-
6	Благодарна	-/-	56,5	-/-
7	Борвий (образец 1)	-/-	40,9	-/-
8	Борвий (образец 2)	-/-	50,3	-/-
9	Бунчук	-/-	44,3	-/-
10	Видрада	-/-	56,7	-/-
11	Вильшана	-/-	53,4	-/-
12	Герта	-/-	51,5	-/-
13	Годувальныця одеська	-/-	57,7	-/-
14	Доброчын	-/-	52,5	-/-
15	Заграва одесская (образец 1)	-/-	46,2	-/-
16	Заграва одесская (образец 2)	-/-	51,2	-/-
17	Заможність	-/-	51,7	-/-

Продолжение таблицы

№	Название сорта, линии	Страна происхождения	Масса тысячи зерен, г	Аллель
18	Истина одесская	-//-	45,7	-//-
19	Калита	-//-	43,2	-//-
20	Кармен	-//-	47,6	-//-
21	Козачий атаман	-//-	52,8	-//-
22	Лорд	-//-	55,1	-//-
23	Миронивська сторична	-//-	49,8	-//-
24	Наусель	-//-	50,2	-//-
25	Одесская 200	-//-	54,5	-//-
26	Подольнка	-//-	59,8	-//-
27	Полевик	-//-	51,9	-//-
28	Почаивка	-//-	55,9	-//-
29	Придесняньска напивкарликова	-//-	59,4	-//-
30	Роксолана	-//-	44,5	-//-
31	Сагайдак	-//-	58,5	-//-
32	Селянка одесская	-//-	51,8	-//-
33	Славна	-//-	56,0	-//-
34	Турунчук	-//-	51,0	-//-
35	Ужинок	-//-	46,7	-//-
36	Уникум	-//-	44,9	-//-
37	Утес	-//-	56,1	-//-
38	Хвест	-//-	47,4	-//-
39	Хоревица (образец 1)	-//-	55,5	-//-
40	Хоревица (образец 2)	-//-	59,5	-//-
41	Элик	-//-	52,7	-//-
42	Эпоха одесская	-//-	46,4	-//-
43	Яворина	-//-	47,5	-//-
44	Ярославна	-//-	47,1	-//-
45	Ариадна	Россия	54,6	-//-
46	Аскет	-//-	42,2	-//-
47	Богданка	-//-	50,6	-//-
48	Дон 95	-//-	55,1	-//-
49	Донской сюрприз	-//-	48,2	-//-
50	Донская полукарликовая	-//-	54,8	-//-
51	Ермак	-//-	52,2	-//-
52	Ершовская 11	-//-	53,8	-//-
53	Жемчужина Поволжья	-//-	50,1	-//-
54	Зарница	-//-	50,9	-//-
55	Короганка	-//-	48,3	-//-
56	Левобережная 1	-//-	55,9	-//-
57	Новоершовская	-//-	56,6	-//-
58	Памяти Калиненко	-//-	45,0	-//-

Окончание таблицы

№	Название сорта, линии	Страна происхождения	Масса тысячи зерен, г	Аллель
59	Проза	-//-	53,3	-//-
60	Ростовчанка 3	-//-	45,0	-//-
61	Синтетик	-//-	56,5	-//-
62	Юнона	-//-	44,8	-//-
63	F.594	-//-	39,4	-//-
64	Emmit	Германия	50,0	-//-
65	Samurai	-//-	55,3	-//-
66	Skagen	-//-	56,3	-//-
67	Faur	Румыния	53,2	-//-
68	Miranda	-//-	55,4	-//-
69	Lupus	Австрия	47,1	-//-
70	Saturnus	-//-	52,1	-//-
71	Акорд	Украина	56,6	<i>TaCwi-1b</i>
72	Acratos	Германия	55,5	-//-
73	Catalus	-//-	53,1	-//-
74	Cubus	-//-	50,3	-//-
75	Dromos	-//-	51,0	-//-
76	Perfect	-//-	50,2	-//-
77	Balaton	Австрия	49,7	-//-
78	Co 207	Франция	47,9	-//-
79	FT Wonder	Канада	56,9	-//-

Как видно из таблицы, 9 (11,4%) исследованных сортов и линий несут в своих геномах аллель *TaCwi-1b*, который может приводить к снижению массы тысячи зерен. При сравнении полученных данных об аллельном составе локуса *TaCwi-1* с данными о фактической массе тысячи семян было выявлено, что линия Co 207 и сорта Balaton, Dromos, Perfect и Cubus имеют мутации в 4-м интроне (АТ→АГ) данного локуса и массу тысячи зерен меньше среднего значения (47,9; 49,7; 51,0; 50,2 и 50,3 г соответственно). Масса тысячи зерен у сортов Акорд, Acratos, Catalus и FT Wonder, также обладающих данной мутацией, оказалась выше средней и составила 56,6; 55,5; 53,1 и 56,9 г соответственно. Средняя масса тысячи зерен 9 сортов и линий, несущих мутацию в данном локусе (*TaCwi-1b* аллель), составила 52,4 г. При этом диапазон значений варьировал от 47,9 до 56,9 г, а стандартное отклонение составило 3,29. Масса тысячи зерен у 70 сортов и линий, несущих

аллель *TaCwi-1a*, благоприятно влияющий на данный показатель, находилась в диапазоне от 39,4 до 59,8 г. и в среднем составила 51,3 г. Стандартное отклонение составило 4,75.

Ген *TaCwi-1*, кодирующий инвертазу клеточной стенки, локализован на хромосоме 2A и состоит из 7 экзонов и 6 интронов, имеющих общую протяженность 3,676 п.н., из которых 1,767 п.н. приходится на открытую рамку считывания. У сортов с более высокой и более низкой массой тысячи зерен в данном локусе Ма с соавторами [3] выявили девять однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), из которых четыре располагаются в интронах и пять – в экзонах. Было установлено, что четыре из пяти однонуклеотидных полиморфизмов в экзонах являются сайленс-мутациями и не приводят к аминокислотным заменам. Мутация в пятом экзоне в позиции 2,845 нп является миссенс-мутацией и приводит к замене лейцина на валин в кодоне 442. Это может частично объяснить различия по массе тысячи

зерен среди сортов, обладающих различными аминокислотами в данном кодоне. Интроны, как известно, играют важную роль в регуляции экспрессии генов [25]. В частности они влияют на транскрипцию ДНК путем альтернативного сплайсинга, что приводит к сдвигу рамки считывания [26]. У высших растений GT-AG являются типичными мишенями для сплайсинга интронов, поскольку все интроны имеют 5'-GT и 3'-AG границы [3].

Результаты исследования показали, что некоторые образцы, несущие в своих геномах мутацию в локусе *TaCwi-A1*, имеют массу тысячи зерен больше, чем сорта и линии, не несущие в своих геномах мутацию в данном локусе. Вероятно, это связано с тем, что признак «масса тысячи зерен» является полигенным и контролируемые его гены расположены практически на всех хромосомах [27, 28]. Локус *TaCwi-A1* является одним из этих генов и анализ его аллельного состава не может объяснить всех фенотипических отличий по данному признаку. Поэтому необходимым и перспективным направлением для улучшения селекционного процесса пшеницы является дальнейшая идентификация и картирование локусов, ответственных за данный признак, а также создание для них функциональных маркеров [3].

Помимо маркер-сопутствующей селекции, для количественных признаков, одним из которых является масса тысячи зерен, перспективным является применение геномной селекции, предложенной Meuwissen et al. [29]. Данный подход основан на одновременном использовании не только основных маркеров, контролируемых определенным признаком, но также и маркеров, оказывающих менее значительный эффект на проявление данного признака для создания модели фенотипов и генотипов с целью определения ценности селекционного материала. В его основе лежит отбор благоприятных аллелей по многим локусам одновременно от обеих родительских форм для улучшения показателей по контролируемым признакам в потомстве. Несмотря на то, что для геномной селекции требуется создание модельной популяции с известными фенотипическими параметрами и хорошим охватом маркеров по геному, что является весьма трудоемким процессом, она имеет множество преимуществ по сравнению

с маркерной селекцией и все чаще используется в селекционном процессе. [30]. В частности, Poland et al. при помощи секвенирования было выявлено 41 371 однонуклеотидных полиморфизма в коллекции CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center), состоящей из 254 улучшенных селекционных линий, используемых в селекционной программе в семиаридных районах. На основании полученных экспериментальных данных авторами были созданы модели геномной селекции пшеницы для таких признаков, как урожайность в орошаемых условиях и условия засухи, время до колошения и масса тысячи зерен. Было показано, что стоимость такого анализа для одного образца составляет 20 долларов. Таким образом, сочетание надежности разработанных маркеров, охвата ими всего генома и низкой стоимости делает генотипирование на основе секвенирования наиболее перспективным методом для геном-сопутствующей селекции пшеницы [31].

Заключение

Изучение полиморфизма локуса *TaCwi-A1* показало, что большинство протестированных сортов и линий (88,6%) пшеницы, используемых в селекционном процессе в Беларуси, содержали аллель *TaCwi-A1a*, обеспечивающий, по литературным данным, более высокую массу тысячи зерен. Вместе с тем, масса тысячи зерен у сортов Акорд, Acratos, Catalus и FT Wonder, несущих аллель *TaCwi-A1b*, присутствие которого должно приводить к снижению данного показателя, оказалась выше средней для изученного коллекционного материала. Вероятно, проявление признака компенсируется другими генами или локусами.

Список использованных источников

1. Interrelationship of polygenic traits affecting grain yield in *Triticum aestivum* L. / A.S.L. M.B. Kumbhar [et al.] // Wheat Inf Serv. – 1983. – Vol. 57. – P. 42–45.
2. Collaku, A. Analysis of the structure of correlations between yield and some quantitative traits in bread wheat / A. Collaku // Buletini i Shkencave Bujqesore. – 1989. – Vol. 28. – P. 137–144.
3. Characterization of a cell wall invertase gene *TaCwi-A1* on common wheat chromosome 2A and

- development of functional markers / J.Y.D. Ma [et al.] // Mol Breeding. – 2012. – Vol. 29. – P. 43–52.
4. Yield components of super wheat cultivars with different types and the path coefficient analysis on grain yield / J.C. Tian [et al.] // Acta Agron Sin. – 2006. – Vol. 32. – P. 1699–1705.
5. Mapping quantitative trait loci for post-anthesis dry matter accumulation in wheat / J.Y. Su [et al.] // Integra Plant Biol. – 2006. – Vol. 48. – P. 938–944.
6. Advanced backcross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.) / X.Q. Huang [et al.] // Theor Appl Genet. – 2003. – Vol. 106. – P. 1379–1389.
7. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring 9 SQ1 and its uses to compare QTLs for grain yield across a range of environments / S.A. Quarrie [et al.] // Theor Appl Genet. – 2005. – Vol. 110. – P. 865–880.
8. QTL analysis of kernel shape and weight using recombinant inbred lines in wheat / X.Y. Sun [et al.] // Euphytica. – 2009. – Vol. 165. – P. 615–624.
9. Sturm, A. Invertase. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning / A. Sturm // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 121. – P. 1–8.
10. Chourey, P.S. Genetic control of cell wall invertases in developing endosperm of maize / P.S. Chourey, Q.B. Li, S.J. Carlson // Planta. – 2006. – Vol. 223. – P. 159–167.
11. Tang, G.Q. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning / G.Q. Tang, A. Sturm // Plant Cell. – 1999. – Vol. 11. – P. 177–189.
12. Miller, M.E. The maize invertase-deficient *miniature-1* seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development / M.E. Miller // Plant Cell. – 1992. – Vol. 4. – P. 297–305.
13. Cheng, W.H. The *Miniature1* seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel / W.H. Cheng, P.S. Chourey // Plant Cell. – 1996. – Vol. 8. – P. 971–983.
14. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication / E. Wang [et al.] // Nat Genet. – 2008. – Vol. 40. – P. 1370–1374.
15. Copenald, L. Enzyme of sucrose metabolism. Methods / L. Copenald // Plant Biochem. – 1990. – Vol. 73–85.
16. Characterization of two members of the maize gene family, *Incw3* and *Incw4*, encoding cell-wall invertases / J.Y. Kim [et al.] // Gene. – 2000. – Vol. 245. – P. 89–102.
17. Seed coat-associated invertase of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression / H. Weber [et al.] // Plant Cell. – 1995. – Vol. 7. – P. 1835–1846.
18. Hirose, T. Cell wall invertase in the developing rice caryopsis: molecular cloning of *OsCINI* and analysis of its expression in relation to its role in grain filling / T. Hirose, T. Terao // Plant Cell Physiol. – 2002. – Vol. 43. – P. 452–459.
19. Sturm, A. cDNA cloning of carrot extracellular b-fructodisase and its expression in response to wounding and bacterial infection / A. Sturm // Plant Cell. – 1990. – Vol. 2. – P. 1107–1119.
20. Godt, D.E. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism / D.E. Godt // Plant Physiol. – 1997. – Vol. 115. – P. 273–282.
21. Genes coding for a putative cellwall invertase and two putative monosaccharide/H⁺ transporters are expressed in roots of etiolated *glycine max* seedlings / M. Dimou [et al.] // Plant Sci. – 2005. – Vol. 169. – P. 798–804.
22. Jain, M. Expression of cell wall invertase and several other genes of sugar metabolism in relation to seed development in sorghum (*Sorghum bicolor*) / M. Jain, Q.B. Li, D.R. Pring // Plant Physiol. – 2008. – Vol. 165. – P. 331–344.
23. Tymowska-Lalanne, Z. Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family / Z. Tymowska-Lalanne // Planta. – 1998. – Vol. 207. – P. 259–265.
24. Plaschke, J. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers / J. Plaschke, M.S. Röder // Theor. Appl. Genet. – 1995. – Vol. 91. – P. 1001–1007.
25. Fedorova, L. Introns in gene evolution / L. Fedorova // Genetica. – 2003. – Vol. 118. – P. 123–131.

26. Bergman, J. The functions of introns: from junk DNA to designed DNA / J. Bergman // *Perspect Sci Chris Faith*. – 2001. – Vol. 53. – P. 170–178.
27. A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat / S.S. Li [et al.] // *Mol Breeding*. – 2007. – Vol. 20. – P. 167–178.
28. QTL analysis for grain weight in common wheat / N. Kumar [et al.] // *Euphytica*. – 2006. – Vol. 151. – P. 135–144.
29. Meuwissen, T.H.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps / T.H.E. Meuwissen, M.E. Goddard // *Genetics*. – 2001. – Vol. 157. – P. 1819–1829.
30. Applying association mapping and genomic selection to the dissection of key traits in elite European wheat / A.R. Bentley [et al.] // *Theor Appl Genet*. – 2014. – Vol. 127. – P. 2619–2633.
31. Genomic selection in wheat breeding using genotyping-by-sequencing / J. Poland [et al.] // *Plant Genome*. – 2012. – Vol. 5, № 3. – P. 103–113.

Дата поступления статьи 10 августа 2015 г.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ (*FRAGARIA ANANASSA*), ВЫРАЩИВАЕМОЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

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

Введение

Земляника (*Fragaria* L.) – род многолетних травянистых растений семейства розовых (*Rosaceae* Juss., надпорядок *Rosanae*). Род *Fragaria* L. включает в себя 25 видов, различающихся по уровню пloidности: 13 диплоидов, 5 тетраплоидов, 1 гексаплоид, 4 октоплоиды и 1 декаплоид [1]. Самым распространенным культивируемым видом является земляника садовая (*Fragaria* × *ananassa*), относящаяся к октоплоидам ($2n=8x=56$). Размер ее генома составляет 708–720 Mb [2]. По данным ФАО, мировое производство земляники садовой за последние годы увеличилось и составляет более 59% валового производства всех ягод. Интенсификация ягодоводства требует использования новых сортов, отвечающих возрастающим современным требованиям, среди которых скороплодность и высокая урожайность, отзывчивость на агротехнику, устойчивость к вредителям и болезням, пригодность для механизированного возделывания и уборки урожая, высокие товарные и технологические качества ягод. Для успешной реализации селекционных программ большое значение имеет идентификация генотипов как сортов, так и гибридов и исходных форм. Сорта земляники имеют значительное внешнее сходство, что затрудняет их идентификацию по фенотипическим признакам. В связи с этим все большее значение приобретает разработка эффективных и надежных методов оценки генетического разнообразия сортов с использованием молекулярных маркеров.

Для изучения генетического разнообразия земляники садовой исследователями разных стран были предложены несколько вариантов молекулярных маркеров: RAPD [3, 4, 5], AFLP [6], ISSR [7]. В 2000 году на основе данных, полученных с помощью RAPD-анализа, в суде была подтверждена сортовая принадлежность

линий земляники садовой и защищены права селекционеров [8]. Однако каждая из этих систем имеет определенные проблемы с воспроизводимостью в различных лабораториях. Этому недостатка лишены SSR-маркеры. Результаты, полученные с их помощью, легко интерпретируются и воспроизводятся. Помимо этого, микросателлитные маркеры наследуются по кодоминантному принципу, и поэтому получили широкое применение для картирования генома и анализа генетической структуры популяции [9]. Первые работы в данном направлении проводились Sargent с сотрудниками, которые в 2003 году разработали и охарактеризовали набор SSR-маркеров для *Fragaria viridis*, диплоидного представителя рода *Fragaria* L. [10]. Позже эта же группа исследователей разработала генетическую карту для межвидового гибрида от скрещивания *F. vesca* × *F. nubicola*. В данном исследовании было картировано 78 маркеров, среди которых 68 SSR-маркеров [11].

В 2008 году Govan с сотрудниками разработали сет из 10 пар SSR-маркеров, характеризующихся высокой воспроизводимостью и информативностью. В исследовании этих авторов было охарактеризовано 60 различных генотипов земляники садовой селекции США, Канады, Японии, Германии, Англии и других европейских стран [12]. Дальнейшее изучение Brunings с сотрудниками генетического разнообразия элитных линий земляники садовой с использованием данного набора маркеров показало значительное снижение аллельного разнообразия селекционных линий по сравнению с родительскими формами [13]. В 2009 году Gil-Ariza с сотрудниками исследовали 92 сорта земляники садовой и показали, что сорта земляники, культивируемые в промышленных масштабах, обладают значительным генетическим сходством. Несмотря

на это, данный метод позволил достоверно различить каждый сорт, а также выявить 3 основные группы в рамках исследуемой выборки [14].

В последние годы в мировом научном сообществе активно ведутся работы, направленные на изучение генетического разнообразия земляники садовой, а также поиск ген-ассоциированных маркеров для селекции по хозяйственно-ценным признакам.

Однако к настоящему времени не существует универсальной методики ДНК-идентификации земляники садовой, на молекулярном уровне изучено ограниченное количество сортов. Сорта белорусской селекции остаются неисследованными. Не изучено, каким генетическим потенциалом они обладают, и какие наборы маркеров эффективны для их идентификации. В связи с этим данное исследование направлено на изучение генетического потенциала сортов земляники садовой, культивируемых в Республике Беларусь.

Материалы и методы

Объектом исследования служили сорта земляники садовой, возделываемой в Республике Беларусь. Материал предоставлен РУП «Институт плодоводства» (пос. Самохваловичи). Выделение тотальной ДНК из фрагмента листа отдельного растения осуществляли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, ЕС) согласно методике производителя. Для анализа полиморфизма по SSR-маркерам использовали

мультиплексную ПЦР, позволяющую проводить реакцию одновременно для 4 пар праймеров в одной микропробирке. Каждая пара имела специфическую флуоресцентную метку (FAM, R6G, TAMRA, ROX). В исследовании использовали SSR-маркеры, специфичные для геномов *F. vesca* [15] и *F. nubicola* [11]. Названия праймеров приведены в табл. 1. Праймеры синтезированы компанией Праймтех (Беларусь).

Состав реакционной смеси, конечным объемом 20 мкл, был следующий: 1×ПЦР буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 мМ MgCl_2 , 200 мкМ смеси dNTP, по 0,2 мкМ каждого из праймеров, 20–50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы (Thermo scientific, ЕС). Реакцию ПЦР проводили по следующей программе: 1 цикл продолжительностью 4 мин при 94 °С; 40 циклов, включающих: 40 с при 94 °С, 1 мин при 58 °С, 1 мин при 72 °С; заключительная элонгация – 7 мин при 72 °С.

Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы GeneMapper® Software v4.1 относительно стандартных образцов ДНК известной длины. В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 (Синтол, Россия).

Дискриминационная сила маркера (PD – Power of Discrimination) была рассчитана по формуле:

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, длина и количество аллелей SSR-локусов в геноме *Fragaria*

Локус	Последовательность праймера	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер фрагментов, п.н.
FG7ab	F GCAGTGCTACATCGACTCAGGTCCAA R ACCAAGGAAGTGCCGAAGTGGGTTT	TCAAATAG	7	136–181
FG7cd	F AGGTGTCCAAAGAGGGTTGCTGTAGA R TCCCTCTCCCAATAACCSTTTGCTTC	TAGGGA	8	228–312
FG2ab	F TGAACCTGGTCCATCGGTGCTGAAA R TGATCACACAATACGCATTACCAAGCCT	TATG	9	316–374
UFFa3-D11	F GCSTTGATGTCTCGTTGAGTAG R TACCTTCTGCATTCACCATGAC	AGA	12	181–219
EMFn002	F GGAACCCCAAATACCAACTTT R AAAGCCTGAAGTTGTTCAATAAA	AC	1	247
EMFn017	F TTTTCAAATGTTACCCCATCC R CTA AAAATCCCCCAAATTGTGA	TC	–	–

$$PD = 1 - \sum(g_i)^2,$$

где g_i – частота встречаемости i -ого генотипа [16].

Дендрограмма генетического сходства сортов земляники садовой была получена с помощью программы Treemap методом UPGMA, основываясь на коэффициенте генетического сходства Nei и Li [17, 18].

Результаты и обсуждение

Для анализа генетического разнообразия земляники садовой, выращиваемой в Республике Беларусь, была сформирована коллекция образцов, включающая различные сорта. В ней представлены как сорта белорусской селекции, так и сорта селекции России, Германии, Польши и других стран.

Для оценки генетического разнообразия 49 сортов земляники садовой было использовано 6 SSR-маркеров. Количество и длина аллелей, определенных в результате SSR-анализа, представлены в табл. 2. Как видно из таблицы, не все рассматриваемые локусы оказались полиморфными.

Так, в локусе EMFn002 выявлен только один аллель длиной 247 п.н. При анализе локуса EMFn017 не удалось получить четкие воспроизводимые результаты. При разделении продуктов амплификации с данным маркером на автоматическом секвенаторе было выявлено большее число аллелей, чем количество возможных вариантов для октоплоидных организмов. Вероятно, это связано с тем, что для данного маркера выбран динуклеотидный повтор (TC), что затрудняет интерпретацию результатов, особенно у полиплоидов. Данные маркеры были исключены из дальнейшего исследования.

Маркеры FG7ab, FG7cd, FG2ab и UFFa3-D11 показали стабильно воспроизводимые результаты. При этом количество аллелей, идентифицированных у сортов *F. ananassa* в каждом локусе, различалось. Наименее полиморфным оказался локус FG7ab. Количество обнаруженных в нем аллелей составило 7. В локусах FG7cd и FG2ab выявлено 8 и 9 аллелей соответственно. Наибольшее количество аллелей (12) было выявлено в локусе UFFa3-D11.

Частота распространения аллелей в локусах была разная. Диаграмма распределения частот встречаемости аллелей в отдельных локусах представлена на рис. 1. Так, в локусе FG7ab аллель 136 п.н. встречался у всех проанализированных образцов. С высокой частотой встречался аллель 148 п.н. (0,8). Частота встречаемости других аллелей составляла от 0,04 до 0,59.

В локусе FG7cd 2 аллеля – 240 п.н. и 249 п.н. – встречались с частотой 0,96 и 0,98 соответственно. Аллель 258 п.н. встречался с частотой 0,78. Наиболее редким явился аллель 299 п.н. (0,06). В локусе FG2ab с наибольшей частотой (0,98) встречались 2 аллеля – 316 п.н. и 334 п.н. Аллели 322 п.н., 342 п.н. и 328 п.н. встречались с частотой 0,76, 0,9 и 0,57 соответственно. В данном локусе также выявлен редкий аллель 374 п.н., встречающийся с частотой 0,02. В локусе UFFa3-D11 аллель 193 п.н. встречался с частотой 0,96. Частота встречаемости аллелей 199 п.н., 205 п.н., 196 п.н., 211 п.н., 181 п.н. также была достаточно высокой и составила 0,9, 0,86, 0,84, 0,63 и 0,67 соответственно. Аллели 186 п.н. (0,25) и 215 п.н. (0,53) встречались реже. Редко встречались аллели 201 п.н. (0,06) и 217 п.н. (0,02).

Таблица 2

Количество и длина SSR-аллелей в геноме *Fragaria* × *ananassa*

Праймер	Детектируемые SSR-аллели в геноме земляники садовой, п.н.
EMFn002	247
EMFn017	–
FG7ab	136, 148, 155, 164, 166, 173, 181
FG7cd	228, 240, 249, 257, 270, 294, 299, 312
FG2ab	316, 320, 322, 328, 334, 338, 342, 362, 374
UFFa3-D11	181, 186, 193, 196, 199, 201, 205, 207, 211, 215, 217, 219

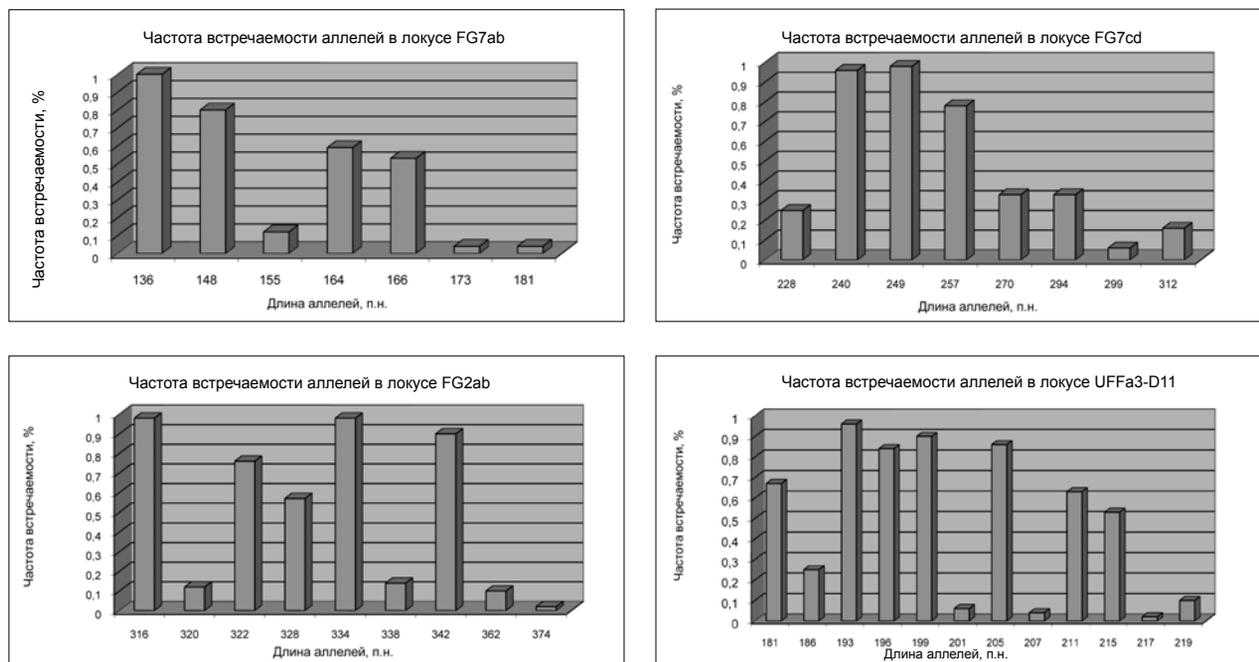


Рис. 1. Диаграмма распределения частот встречаемости аллелей в исследованных локусах

В связи с тем, что земляника садовая является октоплоидом, при исследовании ее генома нельзя использовать ряд показателей, успешно применяемых для характеристики диплоидных видов. Поэтому в представленном исследовании каждый маркер был оценен с помощью такого показателя, как дискриминационная сила маркера (PD). Значение PD, рассчитанное для каждого локуса, колебалось от 0,77 для локуса FG7ab до 0,87 для локуса UFFa3-D11. Среднее значение PD для 4 SSR-локусов составило 0,82.

В общей сложности при анализе 4 локусов микросателлитных последовательностей среди 49 сортов земляники садовой было выявлено 49 различных генотипов. Это свидетельствует о достаточно высоком полиморфизме отобранных SSR-маркеров.

Количество выявляемых аллелей в локусе зависит от состава выборки исследуемых образцов и значительно увеличивается при анализе обширных коллекций. В исследованиях Govan (2008) при изучении генетического разнообразия 60 представителей рода *Fragaria* с применением 10 SSR-маркеров было выявлено 166 аллелей [12]. В исследованиях Brunings при уменьшении выборки до 25 образцов при использовании тех же маркеров было обнаружено 74 аллеля [13]. В данном исследовании использовалась выборка из 49

сортов земляники садовой, которая при анализе по 4 SSR-маркерам позволила выявить 36 аллелей, в среднем 9 аллелей на маркер.

Данные о составе аллелей, выявляемых с помощью 4 SSR-маркеров, были использованы для построения дендрограммы филогенетического сходства сортов земляники садовой. Результаты представлены на рис. 2.

Как видно из дендрограммы, сорта земляники садовой генетически разнородны, однако расположены на относительно небольшом генетическом расстоянии друг от друга. Так, генетическая близость наблюдается между сортами Альфа и Соловушка, что согласуется с данными о происхождении сорта Альфа от скрещивания Соловушка × Индук. Сорта Красный берег и Купава также генетически близки, т.к. сорт Купава получен при скрещивании Red Gountlet × Красный берег. В целом, сорта белорусской селекции на данном этапе исследования не образуют отдельного кластера и генетически тесно связаны с сортами иностранной селекции. Полученные данные согласуются с предыдущими исследованиями Brunings и Gil-Ariza, показавшими, что сорта земляники садовой, культивируемые в промышленных масштабах, обладают значительным генетическим сходством. Сорта культур, обладающих низким генетическим разнообразием, требуют большего количества маркеров для того,

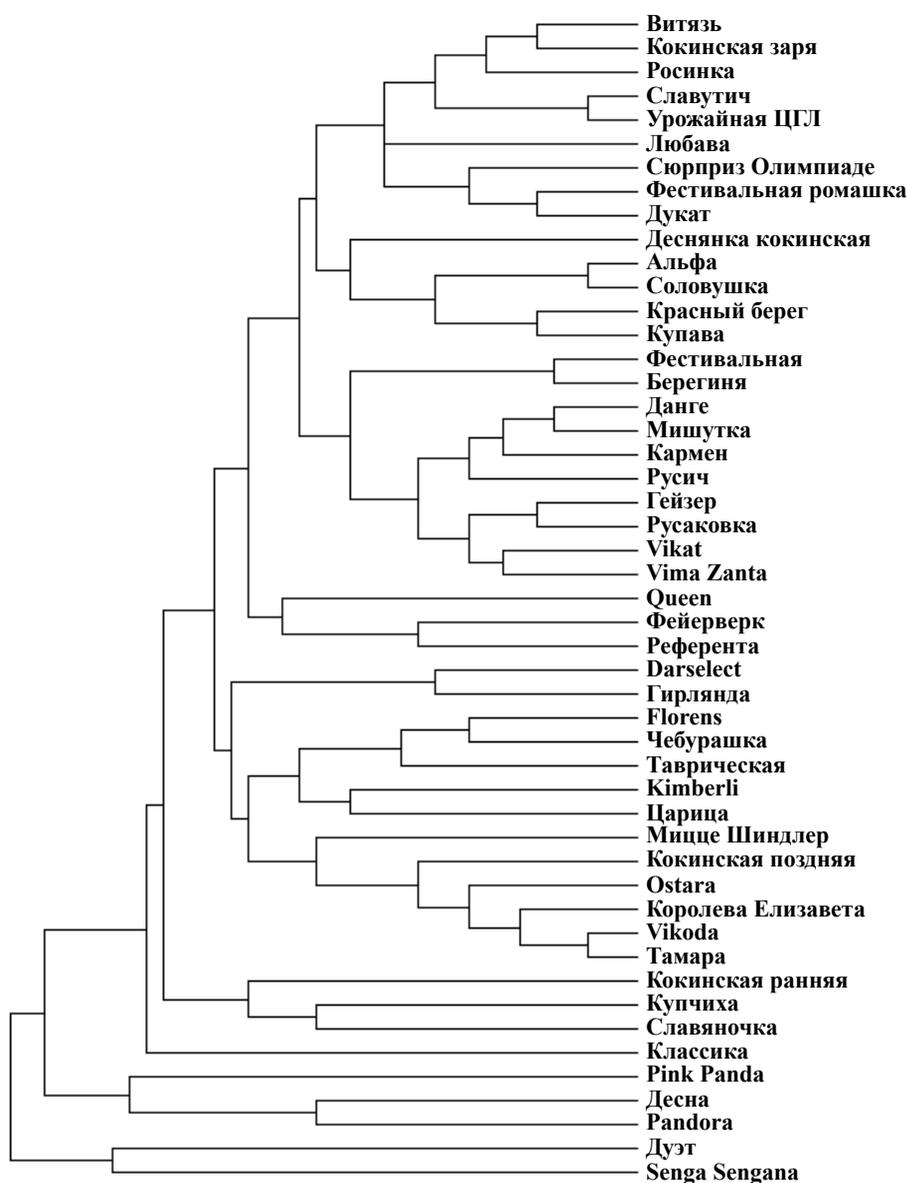


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства образцов земляники, построенная на основе результатов SSR-анализа

чтобы получить уникальную молекулярно-генетическую формулу. Так, количество маркеров, необходимых для ДНК-типирования пшеницы равно 24 [19]. Для идентификации плодовых культур, обладающих высоким генетическим разнообразием, достаточно набора из 6–9 маркеров [9]. В данном исследовании удалось выявить 49 различных генотипов среди 49 сортов земляники садовой. Однако дендрограмма генетического сходства, построенная на основе результатов SSR-анализа, показала небольшие генетические расстояния между сортами. Для более детальной характеристики

генотипов земляники садовой планируется привлечь дополнительные молекулярные маркеры и оценить их эффективность для целей ДНК-идентификации.

Заключение

Молекулярное исследование геномов сортов земляники садовой, выращиваемых в Беларуси, показало, что они характеризуются невысоким генетическим разнообразием. SSR-анализ показал тесную генетическую связь изученных сортов селекции Беларуси, России, Германии, Польши и других стран. Тем не менее, анализ

4 локусов микросателлитных последовательностей среди 49 сортов земляники садовой позволил выявить 49 различных генотипов. Для более детальной характеристики генотипов земляники садовой планируется привлечь дополнительные молекулярные маркеры и оценить их эффективность для целей ДНК-идентификации.

Авторы выражают благодарность руководителю отдела ягодных культур Михайловой Алле Михайловне (РУП «Институт плодородства», Самохваловичи) за предоставленный сортовой материал земляники садовой.

Список использованных источников

1. Staudt, G. Strawberry biogeography, genetics and systematics / G. Staudt // Acta Hort. – 2009. – Vol. 842. – P. 71–84.
2. Estimation of the nuclear DNA content of strawberries (*Fragaria* spp.) compared with *Arabidopsis thaliana* by using dual system flow cytometry / Y. Akiyama [et al.] // Cytologia. – 2001. – Vol. 66. – P. 431–436.
3. DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers / C. Degani [et al.] // Euphytica. – 1998. – Vol. 102, № 2. – P. 247–253.
4. Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina / M. Garcia [et al.] // Plant Breed. – 2002. – Vol. 122, № 1. – P. 76–80.
5. Hancock, J. Randomly amplified polymorphic DNAs in the cultivated strawberry *Fragaria* × *ananassa* / J. Hancock, P. Callow, D.V. Shaw // J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 1994. – Vol. 119, № 4. – P. 862–864.
6. Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) using AFLP mapping / E. Lerceteau-Köhler [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol. 107. – P. 619–628.
7. Arnau, G. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification / G. Arnau, J. Lallemant, M. Bourgoïn // Euphytica. – 2002. – Vol. 129. – P. 69–79.
8. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application / L. Congiu [et al.] // Mol. Ecol. – 2000. – Vol. 9, № 2. – P. 229–232.
9. Урбанович, О.Ю. Молекулярные маркеры идентификации и генотипирования яблоны и груши / О.Ю. Урбанович; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск: Право и экономика, 2013. – 210 с.
10. Sargent, D. Development and characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry / D. Sargent, A. Hadonou, D. Simpson // Mol. Ecol. Notes. – 2003. – Vol. 3, № 4. – P. 550–552.
11. A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria* / D. Sargent [et al.] // Theor Appl Genet. – 2004. – Vol. 109, № 7. – P. 1385–1391.
12. A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F.* × *ananassa* cultivars / C. Govan [et al.] // Mol. Breed. – 2008. – Vol. 22, № 4. – P. 649–661.
13. Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties / A.M. Brunings [et al.] // Euphytica. – 2010. – Vol. 173. – P. 63–75.
14. Impact of plant breeding on the genetic diversity of cultivated strawberry as revealed by expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers / D.J. Gil-Ariza [et al.] // J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 2009. – Vol. 134, № 3. – P. 337–347.
15. A genome-enabled, high-throughput, and multiplexed fingerprinting platform for strawberry (*Fragaria* L.) / A. Chambers [et al.] // Mol. Breeding. – 2013. – Vol. 31. – P. 615–629.
16. PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis / A.D. Kloosterman, B. Budowle, P. Daselaar // Int. J. Leg. Med. – 1993. – Vol. 105, № 257–264.
17. Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W.H. Li // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76. – P. 5269–5273.
18. Van de Peer, Y. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees / Y. Van de Peer, R. De Wachter // Comput. Applic. Biosci. – 1993. – Vol. 9. – P. 177–182.
19. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers / X.Q. Huang [et al.] // Theor Appl Genet. – 2002. – Vol. 105, № 5. – P. 699–707.

Дата поступления статьи 15 августа 2015 г.

ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ АЛЛЕЛЬНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *ADRB2*, *FABP2*, *PPARG*, *FTO*, *ADRB3* И *APOA2* СРЕДИ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ КАЗАХСТАНА

¹РГП «Национальный центр биотехнологии»

Казахстан, 000001, г. Астана, ул. Валиханова, 13/1

²Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева

Казахстан, 000001, г. Астана, ул. К. Мунайтпасова, 5

³Школа наук и технологий, Назарбаев Университет

Казахстан, 000001, г. Астана, пр-т Кабанбай Батыра, 53

Введение

Растущая во всем мире распространенность ожирения во многом зависит от образа жизни, который характеризуется чрезмерным потреблением энергии, а также ее низким расходом. Ежегодно по меньшей мере 2,8 миллиона взрослых умирают по причине избыточного веса или ожирения. Кроме того, 44% случаев диабета, 23% случаев ишемической болезни сердца и от 7 до 41% случаев онкологических заболеваний обусловлены избыточным весом и ожирением [1]. Исследования показывают, что от 20% до 80% отклонений индекса массы тела (ИМТ) у населения объясняется генетическими особенностями, то есть наследственностью [2].

На сегодняшний день известно более 50 локусов, связанных с различными показателями ожирения [3], в том числе ИМТ, соотношение объема талии к бедрам, процента жиров в организме, в том числе подкожного жира и висцерального жира. Эти ассоциации были впервые обнаружены у европейцев. В последнее время повышенный интерес вызывает вопрос, могут ли генетические вариации в генах, чувствительных к питанию, менять реакцию организма в зависимости от режима питания [4, 5]. Для оценки взаимодействия генетики и режима питания необходимы долгосрочные исследования. Первым этапом таких исследований является изучение частот встречаемости в популяции различных аллелей генов-кандидатов, ассоциированных с нарушением метаболизма и диетическими параметрами.

Ген *ADRB2* (*adrenoceptor beta 2*) кодирует бета 2 адренергический рецептор, имеющий высокую степень сродства к адреналину и

обеспечивающий повышение или понижение активности иннервируемой ткани или органа. В геноме человека ген *ADRB2* локализован на участке q31.32 хромосомы 5. Различные полиморфные формы, точечные мутации и/или подавление этого гена связаны с предрасположенностью к метаболическому синдрому, ожирению, бронхиальной астме, в том числе ночной формы, риску развития сахарного диабета 2 типа (СД2) [6].

Ген *ADRB3* (*adrenoceptor beta 3*) кодирует бета-3 адренорецепторы. В геноме человека ген *ADRB3* локализован на участке 8p12. *ADRB3* расположен, главным образом, в жировых клетках, а также в сосудах, в гладких мышцах пищеварительного тракта и скелетных мышцах. Реакции этих рецепторов стимулируют расщепление жиров и повышение температуры. Их действие основано на активации катаболических процессов в клетках, при которых жирные кислоты активно используются для получения энергии [7].

Ген *FABP2* (*fatty-acid-binding proteins*) кодирует белок, связывающий и транспортирующий жирные кислоты в кишечнике. В геноме человека локализован на участке q28-q31 хромосомы 4. *FABP2* обладает высоким сродством к насыщенным жирам и обеспечивает захват, внутриклеточный транспорт и метаболизм длинноцепочечных жирных кислот, действуя в основном в кишечнике [8].

Ген *PPARG* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) кодирует белок-рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом гамма. Ген локализован на хромосоме 3p25.2. Кодируемый ядерный рецептор регулирует экспрессию генов, участвующих в дифферен-

цировке клеток, в метаболизме мышечных тканей и определяющих обмен жиров и углеводов. Ген *PPARG* также влияет на потребность мышечной ткани в глюкозе и ее чувствительность к инсулину. Таким образом, ген *PPARG* вовлечен в патогенез многих заболеваний, включая ожирение, диабет, атеросклероз и рак [9].

Ген *FTO* (*fat mass and obesity associated*) кодирует ядерный белок, вовлеченный в энергетический обмен и влияющий на метаболизм в целом, однако точные физиологические функции этого гена полностью не изучены. Локализован на 16 хромосоме (16q12.2). Ген *FTO* экспрессируется в человеческих тканях, в частности, высокий уровень экспрессии наблюдается в мозге, особенно в гипоталамусе, ответственном за энергетический обмен. Уровень экспрессии гена *FTO* в аркообразном ядре регулируется посредством процессов, ответственных за чувства насыщения и голода.

Полиморфизмы этого гена связаны с накоплением жировой ткани. Многие исследования также показали ассоциацию полиморфизмов этого гена с ИМТ, с риском развития ожирения и сахарного диабета 2 типа [10].

Ген *APOA2* (*apolipoprotein A-II*) кодирует аполипопротеин (апо-) А-II, который является второй наиболее распространенной белковой частицей липопротеинов высокой плотности. Ген локализован на хромосоме 1q23.3. Белок находится в плазме в качестве мономера, гомодимера, гетеродимера аполипопротеина D. Нарушения в этом гене могут привести к гиперхолестеринемии [11].

Целью данного исследования является изучение частот встречаемости аллельных вариантов полиморфизмов генов *ADRB2*, *FABP2*, *PPARG*, *FTO*, *ADRB3* и *APOA2* среди коренного населения Казахстана.

Материалы и методы

В исследование был включен 501 условно здоровый человек казахской национальности. Информированное согласие было получено от всех участников исследования. Возраст участников колебался от 19 до 60 лет ($32,28 \pm 9,76$, $n = 360$). 83,3% участников были мужского пола, и остальные 16,2% были женского пола ($n = 365$).

ДНК из крови выделяли согласно классическому методу высаливания [12]. Качество геномной ДНК контролировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Количественный анализ ДНК проводили с использованием спектрофотометра NanoDrop ND 1000.

Генотипирование полиморфизмов (табл. 1) проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием технологии TaqMan® OpenArray®. Амплификацию проводили на амплификаторе QuantStudio 12K Flex (Life technologies, USA). ПЦР-смеси имели следующий состав: OpenArray Genotyping Master Mix (2,5 мкл/образец) и образец ДНК 50 нг/мкл (2,5 мкл/образец). Реакционный объем составлял 5 мкл. Каждая реакционная смесь была покрыта иммерсионным маслом. Температурный режим: 10 мин при 93 °С; циклирование: 45 с при 93 °С, 13 с при 94 °С, 2,14 мин при 53,5 °С – 50 циклов; инкубация при 25 °С 2 мин.

Таблица 1

Характеристика исследуемых полиморфизмов

SNP	Название гена	Хромосома	Аллели (основной > минорный)	Позиция в гене	Изменение аминокислоты
rs1042713	<i>ADRB2</i> (adrenoceptor beta 2)	5	G>A	exon 1	Arg16Gly
rs1799883	<i>FABP2</i> (fatty-acid-binding proteins)	4	C>T	exon 2	Ala54Thr
rs1801282	<i>PPARG</i> (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)	3	C>G	exon 4	Pro12Ala
rs3751812	<i>FTO</i> (fat mass and obesity associated)	16	G>T	intron	
rs4994	<i>ADRB3</i> (adrenoceptor beta 3)	8	A>G	exon 1	Trp64Arg
rs5082	<i>APOA2</i> (apolipoprotein II)	1	A>G	nearGene-5	

Обработка данных проводилась с помощью программы TaqMan Genotyper Software v. 1.3.

Статистический анализ был проведен с использованием программы SPSSv.16.0. С помощью критерия χ^2 было определено соответствие частот встречаемости аллелей закону Харди-Вайнберга.

Результаты и обсуждение

Были получены частоты встречаемости аллелей и генотипов 6 SNP среди коренных жителей Казахстана. Распределение частот аллелей и генотипов приведено в табл. 2. Частоты аллелей (MAF – Minor Allele Frequency) у казахов были следующими: rs1042713 (G>A) 0,425; rs1799883 (C>T) 0,618; rs1801282 (C>G) 0,849; rs1801282 (C>G) 0,849; rs3751812 (G>T) 0,615; rs4994 (A>G) 0,834 (табл. 2).

Из изучаемых 6 SNP частоты встречаемости 5 SNP (rs1042713, rs1799883, rs1801282, rs3751812, rs4994) соответствовали равновесию Харди-Вайнберга ($p > 0,0008$, коррекция по Бонферрони) (табл. 2).

Полиморфизм rs1042713 находится в 1 экзоне гена *ADRB2*, и его GG генотип является несинонимичным генотипом, где происходит замена нуклеотида аденина на гуанин, приводящая к замене аминокислоты аргинина на глицин в белке (Arg16Gly). Среди населения Казахстана, по полученным данным, распределение генотипов GG, AG и AA составляет 0,299, 0,552 и 0,149 ($n =$

368), соответственно. *ADRB2* участвует в регулировании энергетического баланса посредством стимуляции как термогенеза, так и мобилизации липидов в жировой ткани и катехоламин-индуцированного липолиза в мышечной ткани [13]. Многочисленные исследования выявили ассоциацию между полиморфизмом rs1042713 (Arg16Gly) и риском ожирения, а также с признаками, связанными с этим заболеванием [14, 15].

Полиморфизм rs1799883 находится во 2 экзоне гена *FABP2*, и замена гуанина на аденин в кодоне 54 приводит к замене аланина на треонин в белке (Ala54Thr). В исследуемой выборке данные по частотам встречаемости генотипов полиморфизма rs1799883 (G>A) выглядят следующим образом: 0,345 (CC), 0,546 (CT) и 0,109 (TT). По литературным данным, треонин-содержащий белок обладает в 2 раза большей аффинностью к длинноцепочечным жирным кислотам, чем аланин-содержащий вариант [16]. Многие исследования выявили ассоциацию между этим полиморфизмом и риском развития сахарного диабета 2 типа. Мета-анализ группы ученых Qui et al. (2014) показал, что полиморфизм rs1799883 ассоциирован с риском развития сахарного диабета 2 типа в азиатских популяциях, однако в европейских популяциях эти данные не подтвердились [17]. Также при варианте А полиморфизма rs1799883 (*FABP2*) наблюдаются повышенные уровни холестерина и триглицеридов, а также инсулина и сахара в крови [16].

Таблица 2

Частота аллелей и распределение генотипов среди коренного населения Казахстана

Исследуемый полиморфизм	Количество протипированных образцов	Соответствие равновесию Харди-Вайнберга (p-value)	Аллель (основной>минорный)	Аллель 1	Аллель 2	Частота аллеля 1	Частота аллеля 2	Частота генотипа 1/1	Частота генотипа 1/2	Частота генотипа 2/2
rs1042713	368	0,014	G>A	A	G	0,425	0,575	0,149	0,552	0,299
rs1799883	313	0,005	G>A	C	T	0,618	0,382	0,345	0,546	0,109
rs1801282	407	0,152	C>G	C	G	0,849	0,151	0,730	0,238	0,032
rs3751812	368	0,003	G>T	G	T	0,615	0,385	0,415	0,401	0,184
rs4994	433	0,303	A>G	A	G	0,834	0,166	0,688	0,291	0,021
rs5082	383	0,000	A>G	A	G	0,462	0,538	0,010	0,903	0,086

Полиморфизм rs1801282 находится в 4 экзоне гена *PPARG*, и в результате однонуклеотидной замены цитозина на гуанин в 12 кодоне происходит замена пролина на аланин (Pro12Ala) в белке. Согласно полученным результатам, распределение генотипов (CC, GC, GG) полиморфизма rs1801282 (C>G) в исследованной нами выборке было неравномерным: 0,730, 0,238 и 0,032, соответственно. Несколько исследований показали, что rs1801282 влияет на индивидуальную пользу от диеты с высоким содержанием мононенасыщенных жиров. У людей европейского происхождения, имеющих, по меньшей мере, одну копию аллеля G полиморфизма rs1801282, наблюдалось увеличенное потребление мононенасыщенных жиров, что было связано с сокращением индекса массы тела. Кроме того, диета с низким содержанием жира привела к увеличению окружности талии у носителей аллеля G, однако диета с высоким содержанием мононенасыщенных жиров имела протективный эффект у тех же носителей аллеля G [4]. Также исследования показали, что полиморфизм rs1801282 гена *PPARG* связан с риском развития сахарного диабета 2 типа [18].

Полиморфизм rs3751812 находится в некодирующей области гена *FTO*. Многие исследования показали ассоциацию этого полиморфизма с ИМТ и ожирением. При изучении групп с сахарным диабетом 2 типа минорный аллель T был связан с СД2 [10]. В нашей выборке распределение генотипов GG, GT и TT выглядит следующим образом: 0,415, 0,401 и 0,184, соответственно.

Полиморфизм rs4994 находится в 1 экзоне гена *ADRB3*. Ген *ADRB3* играет важную роль в регуляции величины жировой массы. Мутация в кодоне 64 приводит к замене триптофана на аргинин (Trp64Arg) в белке рецептора и ассоциируется с повышенной массой тела. Результаты показывают, что гомозиготный генотип AA (0,688) полиморфизма rs4994 является преобладающим в исследуемой группе. Частоты распределения генотипов AG и GG равны 0,291 и 0,021 соответственно (n = 433). Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что rs4994 связан с увеличением массы тела, висцеральным ожирением, резистентностью к инсулину и развитием сахарного диабета 2 типа [19, 20].

Полиморфизм rs5082 находится в пределах 5' области гена *APOA2*. Распределение аллельных вариантов GG, AG и AA в исследуемом полиморфизме было неодинаково: 0,086, 0,903 и 0,010, соответственно (n = 383). Следует отметить, что распределение аллелей этого полиморфизма не соответствует равновесию Харди-Вайнберга, и в связи с этим необходимо увеличить исследуемую выборку. По литературным данным, исследуемый полиморфизм связан с увеличением индекса массы тела и потреблением пищи [21].

Заключение

В заключение необходимо отметить, что частоты встречаемости генов предрасположенности к развитию метаболических заболеваний хорошо изучены у европейцев, а у жителей Средней Азии они изучены слабо. Следует отметить, что частоты встречаемости аллельных вариантов гена могут зависеть от расовой и этнической принадлежности. Определение частот встречаемости аллелей генов-кандидатов позволило выбрать значимые для коренного населения Казахстана полиморфизмы для их дальнейшего "case-control" исследования. Таким образом, были определены частоты встречаемости минорных аллелей 6 полиморфизмов (rs1042713, rs1799883, rs1801282, rs3751812, rs4994, rs5082). Исследования в данном направлении продолжаются, проводится генотипирование данных полиморфизмов на большем количестве образцов.

Финансирование работы осуществлено в рамках проекта «Использование генетического тестирования для разработки антивозрастных программ» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан по бюджетной программе 055 «Научная и/или научно-техническая деятельность» подпрограмме 101 «Грантовое финансирование научных исследований», по договору № 152 от 14.02.2014.

Список использованных источников

1. Избыточная масса тела и ожирение в Казахстане [Электронный ресурс] / Zdrav.kz. Все оздоровье, лечения болезней и качественном долголетии. – Режим доступа: http://www.zdrav.kz/sites/default/files/медиа_рус.pdf.

2. Maes, H.H. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity / H.H. Maes, M.C. Neale, L.J. Eaves // *Behavior genetics*. – 1997. – № 27(4). – P. 325–531.
3. Fall, T. Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome / T. Fall, E. Ingelsson // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2014. – № 382(1). – P. 740–757.
4. The Mediterranean diet protects against waist circumference enlargement in 12Ala carriers for the PPARgamma gene: 2 years' follow-up of 774 subjects at high cardiovascular risk / C. Razquin [et al.] // *The British journal of nutrition*. – 2009. – № 102(5). – P. 672–679.
5. Genome-wide meta-analysis of observational studies shows common genetic variants associated with macronutrient intake / T. Tanaka [et al.] // *The American journal of clinical nutrition*. – 2013. – № 97(6). – P. 1395–1402.
6. Contopoulos-Ioannidis, D.G. Meta-analysis of the association of beta 2 adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes / D.G. Contopoulos-Ioannidis, E.N. Manoli, J.P. Ioannidis // *J Allergy Clin Immunol*. – 2005. – № 115(5). – P. 963–972.
7. Physical activity and the association of common *FTO* gene variants with body mass index and obesity / E. Rampersaud [et al.] // *Arch Intern Med*. – 2008. – № 168(16). – P. 1791–1797.
8. Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis / J. Masugi [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2000. – № 268(1). – P. 178–182.
9. Ala12Ala genotype of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 protects against atherosclerosis / T. Temelkova-Kurktschiev [et al.] // *J. Clin. Endocr. Metab*. – 2004. – № 89. – P. 4238–4242.
10. Ассоциация полиморфизма гена *FTO* с избыточной массой тела в российской популяции / Э.С. Насибулина [и др.] // *Казанский медицинский журнал*. – 2012. – № 5(93). – С. 1–4.
11. Expression and purification of recombinant human apolipoprotein A-II in *Pichia pastoris* / M. Su [et al.] // *Assay Drug Dev Technol*. – 2013. – № 11(8). – P. 501–507.
12. Miller, S.A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells / S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky // *Nucleic Acids Research*. – 1988. – № 16(3). – P. 1215.
13. Jocken, J.W. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity / J.W. Jocken, E.E. Blaak // *Physiol Behav*. – 2008. – № 94. – P. 219–230.
14. Studies of the associations between functional beta2-adrenergic receptor variants and obesity, hypertension and type 2 diabetes in 7,808 white subjects / A.P. Gjesing [et al.] // *Diabetologia*. – 2007. – № 50. – P. 563–568.
15. Role of β 2-Adrenergic Receptor Polymorphisms on Body Weight and Body Composition Response to Energy Restriction in Obese Women: Preliminary Results / J.R. Ruiz [et al.] // *Obesity*. – 2011. – № 19. – P. 212–215.
16. Association of the A/T54 polymorphism in the intestinal fatty acid binding protein with variations in plasma lipids in The Framingham Offspring Study / J.R. Galluzzi [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2001. – № 159(2). – P. 417–424.
17. Association between *FABP2* Ala54Thr polymorphisms and type 2 diabetes mellitus risk: a HuGE Review and Meta-Analysis / C. Qiu [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2014. – № 18(12). – P. 2530–2535.
18. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls // *Nature*. – 2007. – № 447(7145). – P. 661–678.
19. Influence of the Trp64Arg polymorphism in the beta 3 adrenoreceptor gene on insulin resistance, adipocytokine response, and weight loss secondary to lifestyle modification in obese patients / D. de Luis [et al.] // *European J. of Internal Medicine*. – 2007. – № 18. – P. 587–592.
20. The Trp64Arg polymorphism of the beta 3 adrenergic receptor gene and obesity in Chinese subjects with components of the metabolic syndrome / G. Thomas [et al.] // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. – 2000. – № 25. – P. 545–551.
21. The -256T>C polymorphism in the apolipoprotein A-II gene promoter is associated with body mass index and food intake in the genetics of lipid lowering drugs and diet network study / D. Corella [et al.] // *Clin Chem*. – 2007. – № 53(6). – P. 1144–1152.

Дата поступления статьи 4 июня 2015 г.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ МУТАЦИЙ *BRCA1*, *BRCA2* И *CHEK2* У ПАЦИЕНТОК С ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»
Республика Беларусь, 246040, г. Гомель, ул. Ильича, 290

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является одной из ведущих причин смерти и одной из наиболее часто диагностируемых форм рака среди женщин в большинстве стран. Заболеваемость этой онкопатологией в последние десятилетия неуклонно нарастает. Вместе с тем увеличивается и число зарегистрированных случаев развития первично-множественных опухолей молочной железы. С 2000 по 2010 гг. в Беларуси было выявлено 345 случаев первично-множественного (ПМ) РМЖ [1].

Понятие ПМ РМЖ предполагает возникновение двух и более злокачественных опухолей в молочных железах у одного пациента. К ПМ РМЖ относят мультицентрические (клонально разнородные) односторонние опухоли молочной железы, но не мультифокальные (клонально однородные метастатические) опухоли. Билатеральные опухоли молочных желез являются ПМ РМЖ в случае, когда доказано их неметастатическое и нерезидивное происхождение [2].

Особое внимание при изучении ПМ РМЖ уделяют наследственным синдромам, которые сопряжены с развитием первично-множественных злокачественных опухолей (ПМЗО). Опубликованы данные о том, что среди близких родственников пациентов с ПМЗО значительно увеличена частота данной формы онкопатологии [1].

В 90-х годах прошлого столетия была доказана взаимосвязь наследственных мутаций ряда генов с повышенной частотой развития онкологических заболеваний. В случае РМЖ наиболее значимыми являются мутации генов *BRCA1* и *BRCA2*, которые выявляют у 20–50% пациенток с наследственным РМЖ.

Важно то, что носители *BRCA*-мутаций имеют повышенный риск развития вторых первичных ипсилатеральных (около 40%) и

контрлатеральных (около 60%) опухолей молочной железы [3]. При планировании лечения больных РМЖ с мутациями в генах *BRCA1* или *BRCA2* рекомендуют учитывать, что проведение органосохраняющих операций с последующей лучевой терапией очень часто сопровождается развитием новых опухолей в оставшейся ткани молочных желез [4].

Еще одним из генов, связанных с наследственной предрасположенностью к РМЖ, является ген *CHEK2*. Частота мутаций этого гена в восточно-европейской популяции достаточно высока и сопоставима с частотой некоторых founder-мутаций гена *BRCA1*. Одна из наиболее значимых мутаций гена *CHEK2* 1100delC выявляется у 1–1,5% пациенток с РМЖ, поэтому, несмотря на невысокую пенетрантность, многие исследователи рекомендуют тестировать ее при определении наследственной предрасположенности к РМЖ. В отдельных публикациях приведены сведения о повышенной частоте мутаций гена *CHEK2* (до 5%) у пациенток с признаками наследственного РМЖ, в том числе и с ПМ РМЖ [5, 6, 7].

Данное исследование посвящено изучению генетического фактора в группе пациенток с ПМ РМЖ из белорусской популяции. Полученные сведения могут быть использованы при формировании групп онкогенетического риска, планировании диспансеризации и лечения соответствующей категории пациенток.

Целью работы является анализ частоты наиболее значимых наследственных мутаций генов *BRCA1*, *BRCA2* и *CHEK2* в группе женщин с ПМ РМЖ.

Материалы и методы

В исследовании на добровольной основе приняли участие 849 пациенток с РМЖ, которые проходили лечение в Учреждении «Гомель-

ский областной клинический онкологический диспансер» и были включены в проект независимо от наличия клинико-морфологических признаков. К основной группе были отнесены 82 женщины с ПМ РМЖ, в том числе 53 (64,6%) пациентки с билатеральным РМЖ (БРМЖ) и 29 (35,4%) с унилатеральным РМЖ. Группу сравнения составили 767 женщин с РМЖ, у которых злокачественный процесс в молочных железах не был первично-множественным. Медиана и квартили возраста в группах составили соответственно 48 (42; 59) лет и 49 (44; 59) лет. Образцы ДНК выделялись из венозной крови пациенток, забранной после подписания формы информированного согласия. Выделение ДНК и молекулярно-генетическое тестирование на наличие наиболее значимых мутаций генов *BRCA1* (185delAG, 300T>G, 4153delA, 5382insC), *BRCA2* (6174delT) и *CHEK2* (1100delC) осуществлялось посредством ранее описанных методов [8]. При выполнении статистического анализа использовался пакет прикладных программ Statistica 6.1. Сравнение групп выполнялось с применением

критериев Манн-Уитни и χ^2 Пирсона, расчет отношения шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (95% ДИ) производился по стандартным формулам.

Результаты и обсуждение

Изучаемые группы не различались по возрасту и большинству клинических признаков РМЖ, таких как размер опухоли, регионарное метастазирование, степень злокачественности, рецепторный статус. Однако необходимо отметить, что частота присутствия в анамнезе первичных опухолей иной локализации, в частности рака яичников (РЯ), была в группе ПМ РМЖ почти в два раза больше, при этом различия были статистически незначимы (табл. 1).

ПМ РМЖ в 26,8% случаев сопровождался наличием РМЖ или РЯ у родственников пациенток, что в 2,4 раза больше, чем в группе с единственными опухолями (уровень значимости $p < 0,001$).

В результате проведенного тестирования пациенток с РМЖ на наличие наиболее значимых мутаций генов *BRCA1*, *BRCA2* установлена

Таблица 1

Признаки РМЖ в зависимости от наличия первично-множественного РМЖ

Признаки РМЖ	Первично-множественный РМЖ		Уровень значимости различий (χ^2)	ОШ	95% ДИ ОШ
	Нет	Да			
Количество случаев	767 (90,3%)	82 (9,7%)	–	–	–
Семейный анамнез РМЖ или РЯ (I–II степень родства)	11,1% (85/767)	26,8% (22/82)	<0,001	2,94	1,72–5,04
Размер опухоли: T3, T4 / T1, T2	4,3% (33/761)	4,9% (4/81)	0,802	1,15	0,40–3,32
Регионарное метастазирование: N2, N3 / N0, N1	13,8% (105/760)	21% (17/81)	0,081	1,66	0,93–2,94
Степень злокачественности: G3 / G1, G2	49,1% (357/727)	39,5% (30/76)	0,110	0,68	0,42–1,09
Наличие в анамнезе рака иной локализации	5,2% (40/767)	9,8% (8/82)	0,091	1,96	0,89–4,35
Наличие в анамнезе рака яичников	1,3% (10/767)	2,4% (2/82)	0,408	1,89	0,41–8,79
Негативный статус рецепторов эстрогена ER-	32,1% (169/527)	38,9% (14/36)	0,398	1,35	0,67–2,70
Негативный статус рецепторов прогестерона PR-	37,1% (206/556)	39,5% (15/38)	0,765	1,11	0,57–2,17
Негативный статус Her2new: –, + / ++, +++	33,7% (85/252)	26,3% (5/19)	0,508	0,70	0,24–2,01

общая частота мутаций 10,7%. Частоты отдельных мутаций варьировали от 0,4% в случае мутации 6174delT гена *BRCA2* до 7,9% для мутации 5382insC гена *BRCA1*. Мутация 5382insC описана как наиболее распространенная в восточно-европейской славянской популяции мутация гена *BRCA1*, она определяется в 60–80% из всех случаев носительства мутаций этого гена [9]. В нашей работе ее частота составила 73,6% от всех выявленных мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2*, она была определена у 67 пациенток. Кроме того, у 8 пациенток была обнаружена мутация 1100delC *CHEK2*, ее частота составила 0,9%.

Анализ частоты мутаций в группе пациенток с ПМ РМЖ показал, что пациентки с этой формой патологии статистически значимо чаще являлись носительницами мутаций генов

BRCA1, *BRCA2* (табл. 2). При этом частота мутаций превышала таковую в группе пациенток без признаков множественности опухолей в 3,1 раза – 28% и 8,9% соответственно. Отношение шансов определения указанных мутаций было равно 4,01 (95% ДИ 2,33–6,89). При выделении из группы ПМ РМЖ пациенток с БРМЖ, установлено, что в этой подгруппе частота мутаций была еще более высокой – 41,5%, что больше, чем в других подобных исследованиях. Например, в публикации А. Musolino et al. частота мутаций в группе с БРМЖ составила 25%, в публикации J. Rogozińska-Szczepka et al. – 29,6% [10, 11]. В некоторых работах, где тестировались не все из изучаемых в нашей работе мутаций, приведена еще меньшая частота (12,5%) мутаций для группы БРМЖ [5].

Таблица 2

Частота и спектр наследственных мутаций генов *BRCA1*, *BRCA2* и *CHEK2* в зависимости от наличия первично-множественного РМЖ

Мутации	Первично-множественный РМЖ		Уровень значимости различий (χ^2)	ОШ	95% ДИ ОШ
	Нет	Да			
Любая из мутаций <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	8,9% (68/767)	28% (23/82)	<0,001	4,01	2,33–6,89
5382insC <i>BRCA1</i>	6,8% (52/767)	18,3% (15/82)	<0,001	3,08	1,65–5,76
300T>G <i>BRCA1</i>	0,7% (5/767)	3,7% (3/82)	0,007	5,79	1,36–24,67
4153delA <i>BRCA1</i>	0,8% (6/767)	1,2% (1/82)	0,677	1,57	0,19–13,17
185delAG <i>BRCA1</i>	0,4% (3/767)	3,7% (3/82)	0,001	9,67	1,92–48,72
6174delT <i>BRCA2</i>	0,3% (2/767)	1,2% (1/82)	0,164	4,72	0,42–52,65
1100delC <i>CHEK2</i>	0,8% (6/767)	2,4% (2/82)	0,140	3,17	0,63–15,97

Narod S.A., проанализировав данные ряда публикаций, объясняет различия между исследованиями в частотах мутаций при БРМЖ отличиями в изучаемых группах. Так пациентки более молодого возраста на момент выявления первой опухоли, как и пациентки с семейной историей РМЖ, имеют значительно большую вероятность обнаружения мутаций, вне зависимости от наличия билатерального поражения молочных желез [12]. В нашей работе в общей группе медиана возраста на момент постановки диагноза РМЖ была 49 (квартили 44; 59) лет, то есть наблюдалось некоторое смещение в сторону молодых возрастов, по

сравнению с республиканским значением за 2000–2010 гг., которое составило 59 (49; 69) лет. В тоже время между изучаемыми группами различий по возрасту не наблюдалось ($p = 0,545$).

При анализе отдельных мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2*, установлено, что частоты были больше в группе с ПМ РМЖ. В то же время, статистически значимыми различия были только для мутаций 5382insC, 300T>G и 185delAG гена *BRCA1*, отношение шансов равно соответственно 3,08 (95% ДИ 1,65–5,76), 5,79 (1,36–24,67) и 9,67 (1,92–48,72). В работе Бит-Сава с соавторами приводятся данные о повышенной частоте ПМ РМЖ у носителей

мутации 4153delA *BRCA1* по сравнению с 5382insC и 185delAG (встречаемость БРМЖ составила 25, 20 и 18,2% соответственно) [13], в то время как в нашем исследовании наблюдалось обратное распределение частот – 14,2%, 22,4 и 50%.

В публикации, основанной на результатах анализа группы пациенток из Гродненской области Беларуси так же, как и в нашей работе, было установлено преобладание частоты мутаций генов *BRCA1*, *BRCA2* при ПМ РМЖ. Несмотря на более низкую, по сравнению с нашей работой, общую частоту выявленных мутаций, отношение шансов 3,99 (95% ДИ 1,38-11,47) наличия мутаций для пациенток из указанной группы было близким по значению к полученному в данном исследовании [14].

Анализ мутации 1100delC гена *CHEK2* не показал статистически значимых отличий между группами исследования, несмотря на трехкратное превышение частоты мутаций в группе ПМ РМЖ. В публикации российских ученых частота мутации 1100delC *CHEK2* в группе БРМЖ (2,0%) приблизительно соответствовала полученной нами [5]. В работе канадских исследователей, напротив, не обнаружено различий в частоте данной мутаций между пациентками с первично-множественным РМЖ и в случаях с единственной опухолью, были определены частоты мутаций 0,7% и 0,8% соответственно [15].

Заключение

Данные, полученные в результате выполнения работы, позволяют заключить, что первично-множественный рак молочной железы у пациенток из белорусской популяции сопровождается высокой суммарной частотой мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* (она составила 28%) что статистически значимо больше (в 3,1 раза) по сравнению с пациентками с единственной опухолью молочной железы. Выявлены статистически значимые различия в частоте таких мутаций гена *BRCA1*, как 5382insC, 300T>G и 185delAG. Кроме того, в группе пациенток с ПМ РМЖ была отмечена повышенная частота мутации 1100delC *CHEK2* – 2,4%, при этом различия между группами были статистически не значимы.

Список использованных источников

1. Первично-множественный рак молочной железы в Беларуси / Ю.И. Аверкин [и др.] // Здоровоохранение (Минск). – 2011. – № 9. – С. 52–55.
2. Сорокин, В.М. К вопросу о регистрации и учете больных с первично-множественными злокачественными новообразованиями / В.М. Сорокин // Онкология (Украина). – 2001. – Т. 3, № 2–3. – С. 136–138.
3. Аллельные варианты в генах *BRCA1*, *BRCA2*, TP53, ассоциированные с развитием рака молочной железы / К.В. Сытенкова [и др.] // Современная онкология. – 2011. – № 3. – С. 22–26.
4. Предрасположенность к раку молочной железы: этиология, клинические особенности и профилактика / Л.Н. Любченко [и др.] // Медицинская генетика. – 2007. – Т. 6, № 6 (60). – С. 3–8.
5. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России / А.П. Соколенко [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № 3 (27). – С. 43–49.
6. The *CHEK2* 1100delC variant acts as a breast cancer risk modifier in non-*BRCA1/BRCA2* multiple-case families / R.A. Oldenburg [et al.] // Cancer research. – 2003. – Vol. 63. – P. 8153–8157.
7. *CHEK2* 1100delC mutation is frequent among Russian breast cancer patients / E.V. Chekmariova [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2006. – Vol. 100, № 1. – P. 99–102.
8. Оценка наследственной предрасположенности к раку молочной железы посредством тестирования наиболее частых мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* в группе пациенток из Гомельского региона Беларуси / А.Е. Силян [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2009. – № 22 (4). – С. 100–107.
9. Наследственная предрасположенность к раку молочной железы / А.В. Карпунин [и др.] // Медицинская генетика. – 2002. – Т. 1, № 6. – С. 25–261.
10. Molecular profile and clinical variables in *BRCA1*-positive breast cancers. A population-based study / A. Musolino [et al.] // Tumori. – 2005. – Vol. 91, № 6. – P. 505–512.
11. *BRCA1* and *BRCA2* mutations as prognostic factors in bilateral breast cancer patients / J. Rogozińska-Szczepka [et al.] // Annals of

oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. – 2004. – Vol. 15. – P. 1373–1376.

12. Narod, S.A. Bilateral breast cancers. / S.A. Narod // Nature reviews. Clinical oncology. – 2014. – Vol. 11. – P. 157–166.

13. Бит-Сава, Е.М. Генотип-фенотипические корреляции у больных раком молочной железы с мутациями *BRCA1* (4153delA, 185delAG, 5382insC) / Е.М. Бит-Сава, В.Ф. Семглазов, Е.Н. Имянитов // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2014. – № 2. – С. 8–11.

14. Курстак, И.А. Оценка значения первичной множественности новообразований у пациенток с раком молочной железы при прогнозировании мутаций в генах *BRCA* / И.А. Курстак // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора М.В. Кораблева. Гродно, 18–19 апреля 2013 г. / редкол.: В.А. Снежицкий (отв. ред.), В.В. Воробьев, В.В. Зинчук. – Гродно, 2013. – С. 252–253.

15. Frequency of the *CHEK2* 1100delC mutation among women with breast cancer: an international study / S. Zhang [et al.] // Cancer research. – 2008. – Vol. 68, № 7. – P. 2154–2157.

Дата поступления статьи 7 августа 2015 г.

Ю.М. Борисов¹, Е.В. Черепанова¹, И.А. Кришук², Е.С. Гайдученко², М.Е. Никифоров², О.О. Григорьева¹, В.Н. Орлов¹

ВЛИЯНИЕ КЛИМАТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПОСЛЕЛЕДНИКОВЬЕ НА АРЕАЛЫ ХРОМОСОМНЫХ РАС ОБЫКНОВЕННОЙ БУРОЗУБКИ, *SOREX ARANEUS* L. (MAMMALIA) В БЕЛАРУСИ

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
Россия, г. Москва, 119071, Ленинский пр-т, 33

²Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Известно, что климатические изменения при чередовании холодных и теплых эпох плейстоцена и связанные с ними процессы фрагментации и расширения ареалов автохтонных видов изменяли генетическую структуру популяций [1–3]. Для реконструкции филогенетических связей между популяциями, наряду с молекулярным анализом ДНК, может быть применен анализ географического распространения хромосомных перестроек. Робертсоновские транслокации хромосом, из-за несовместимости в одной популяции метацентрических хромосом неполной гомологии, маркируют границы первоначального контакта расселяющихся популяций.

Обыкновенная бурозубка, *Sorex araneus* L., благодаря своему исключительному хромосомному полиморфизму, является одним из модельных объектов для популяционно-генетических исследований. Известно более 70 хромосомных рас этого вида, которые различаются по робертсоновским (Rb) транслокациям хромосом 10 пар акроцентриков в разных комбинациях [4–6]. Эти 10 пар акроцентриков и сформированные из них метацентрики названы диагностическими [7]. Кариотип, в котором 10 пар диагностических хромосом представлены акроцентриками (*g, h, i, k, m, n, o, p, q, r*), считается исходным в эволюции *S. araneus* [8]. Такой кариотип был обнаружен только в двух эндемичных изолированных популяциях в Альпах и на Балканах [9, 10]. Фиксация Rb транслокаций могла происходить в малочисленных изолированных популяциях, например, в ледниковых рефугиумах. Молекулярно-генетические и кариологические данные свидетельствуют

о существовании множества рефугиумов в Европе [2, 3, 11], на Южном Урале и в Сибири [12].

На территории бассейна верхнего Днепра и Припяти были обнаружены полиморфные популяции, относящиеся к четырем хромосомным расам: *Białowieża*, Западная Двина, Нерусса и Киев, характеризующиеся низкой частотой диагностических метацентриков [13–17]. Хромосомные расы Западная Двина и Нерусса на основных частях своих ареалов мономорфны по пяти робертсоновским транслокациям [15, 18–20]. В полиморфных популяциях рас *Białowieża* и Западная Двина встречались кариотипы с 10 парами акроцентриков [16, 17]. Таких кариотипов не было обнаружено в полиморфных популяциях на территории западной Европы, где даже при высокой частоте акроцентриков один или два метацентрика фиксированы [21–23].

Согласно палеонтологическим данным, фауна млекопитающих в бассейне верхнего Днепра во время Валдайского оледенения и последующего значительного отличалась от фауны на соседних территориях центральной Европы [24]. Своеобразие фауны верхнего Днепра и обнаруженный хромосомный полиморфизм позволяют предположить, что на этой территории ранее существовала хромосомная раса с 10 парами акроцентрических хромосом, и полиморфные популяции сформировались в результате гибридизации между акроцентрической расой и окружающими ее метацентрическими расами [15–17].

При значительном числе исследований, посвященных гибридным зонам *S. araneus* [6, 25], возможность изучить гибридизацию акроцентрической расы с метацентрически-

ми не была реализована по той причине, что контакты расы *Pelister* на Балканах с другими хромосомными расами неизвестны, а зона контакта расы *Cordon* с ближайшими к ней расами значительно ограничена водной преградой [8, 9, 26]. Полиморфные популяции *S. araneus* на территории Беларуси представляют уникальную возможность для исследования процессов гибридизации нескольких метацентрических хромосомных рас *S. araneus* с существовавшей в прошлом на территории Беларуси автохтонной акроцентрической расой этого вида. Предполагается, что метацентрики распространяются в ареале акроцентрической расы беспрепятственно и их распространение может быть ограничено только встречным потоком метацентриков неполной гомологии, происходящих от другой метацентрической расы.

Цель данной работы – проанализировать уникальные процессы гибридизации нескольких метацентрических хромосомных рас *S. araneus* с существовавшей в прошлом на территории Беларуси автохтонной акроцентрической расой.

Материалы и методы

Бурозубки были отловлены в 12 пунктах на юго-востоке Беларуси в 2013–2014 гг. Кариотипы 65 особей представлены в данном сообщении впервые. Наши ранее опубликованные данные по 157 особям [15–17], а также данные других исследователей по 187 особям [13, 14, 27] были использованы для уточнения ареалов диагностических метацентриков. Всего 409 бурозубок из 40 пунктов были проанализированы в данном исследовании (таблица, рис. 1).

Частота диагностических метацентриков рас *Bialowieza*, Киев, Западная Двина, Лепель и Нерусса

№	Пункт	С.ш., в.д.	Число особей	Метацентрики				Источник
				<i>Bialowieza</i>				
				<i>gr</i>	<i>hn</i>	<i>ik</i>	<i>mp</i>	
1	Беловеж	52°42', 23°52'	166	0,99	1,00	1,00	0,95	[27]
2	Гродно	53°38'42", 23°54'11"	1	1,00	1,00	1,00	1,00	[17]
3	Ганцевичи	52°45'35", 26°24'18"	2	0,25	1,00	1,00	0,50	
4	Любань	52°47'44", 28°0'40"	1	0,00	1,00	0,50	0,0	
5	Червоное	52°22'37", 28°00'02"	15	0,03	0,67	0,50	0,07	
6.1	Туров	52°04'15", 27°45'48"	14	0,02	0,47	0,45	0,00	
6.2	Туров	52°02', 27°56'	1					[14]
6.3	Хвоенск	52°2'11", 27°56'40"	15					
7.1	Рожанов	52°34'26", 28°44'37"	14	0,00	0,41	0,15	0,02	[17], *
7.2	Затишье	52°35'51", 28°45'08"	8					
8	Конковичи	52°9'22", 28°43'30"	7	–	0,14	0,14	–	[17]
				Киев				
				<i>gm</i>	<i>hi</i>	<i>ko</i>		
9	Житомир	50°17', 28°33'	5	0,40	1,00	0,60		[14]
10	Ельск	51°45'18", 29°9'0"	5	0,10	0,70	0,00		[17], *
11	Мозырь	52°01'43", 29°19'20"	2	0,25	0,50	1,00		
12	Лешня	52°3'20", 28°49'10"	12	0,04	0,67	0,21		
13	Лучицы	52°27'16", 28°48'35"	5	0,10	0,10	0,00		
14	Речица	52°22'28", 30°19'15"	9	0,00	0,83	0,50		
15	Озаричи	52°14', 29°13'	3	0,00	0,50	0,33		[17]
16	Светлогорск	52°37'27", 29°41'49"	7	0,00	0,71	0,14		*

Продолжение таблицы

№	Пункт	С.ш., в.д.	Число особей	Метацентрики					Источник	
				Киев						
				<i>gm</i>	<i>hi</i>	<i>ko</i>				
17	Паричи	52°48'04", 29°25'58"	8	0,00	0,56	0,13			*	
18.1	Бобруйск	53°0'60", 29°12'4"	1	0,00	0,50	0,00			*	
18.2	Бобруйск	53°2', 29°15'	2						[14]	
				Западная Двина						
				<i>gm</i>	<i>hk</i>	<i>ip</i>	<i>No</i>	<i>qr</i>		
19.1	Березино	53°46'40", 28°55'12"	10	0,02	0,59	0,00	0,00	0,00	[16]	
19.2	Березино	53°48'19", 28°0'14"								
20.1	Лесковичи	53°55'48", 29°7'41"	7	0,64	0,86	0,00	0,00	0,00		
20.2	Михевичи	54°1'20", 29°9'57"								
21.1	Выдрица	54°10'32", 29° 2'59"	12	1,00	1,00	0,00	0,42	0,08		
21.2	Велятичи	54°9'45", 28°54'54"								
21.3	Новая Метча	54°10'1", 28°42'51"								
22	Малый Вязок	54°10'0", 29°11'25"	25	0,74	0,98	0,00	0,32	0,10		[15, 16]
23.1	Смоляны	54°34'32", 30°3'57"	2	0,50	1,00	0,50	1,00	0,70		[15]
23.2	Дубровно	54°34'8", 30°38'2"	3							
24	Кардымово	54°57'33", 32°13'16"	2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		
				Лепель						
				<i>gm</i>	<i>hk</i>	<i>ip</i>	<i>nq</i>	<i>or</i>		
25	Лепель	54°40', 28°30'	3	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	[13]	
26	Бесяды	54°13', 27°46'	2	0,50	1,0	0,50	0,50	0,50	[14]	
27	Воложин	53°55'3.33", 26°19'40"	4	0,63	1,00	0,50	0,00	0,38	*	
				Нерусса						
				<i>go</i>	<i>hi</i>	<i>kr</i>	<i>mn</i>	<i>pq</i>		
28	Спас-Деменск	54°24', 33°58'	6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	[13]	
29	Новозыбков	52°31', 31°50'	3	0,67	1,00	0,67	1,00	0,00		
30	Березна	51°38', 31°40'	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	[14]	
31	Добруш	52°26', 31°27'	5	0,00	0,90	0,30	0,50	0,00	*	
32	д. Хотетское (Речицкий р-н)	52°25'55", 30°23'16"	3	0,00	1,00	0,33	0,50	0,00	*	

Примечание. Выборки из близких пунктов объединены. * – новые данные

Материалом для генотипирования по гену *cut b* послужили 14 бурозубок Беларуси из зоны распространения метацентриков рас Западная Двина–Борисов (г. Борисов – BEL261-08, BEL268-08, BEL270-08), из зоны распространения метацентриков расы Киев (Паричи – BEL156-12, BEL213-12, BEL217-12, Рожанов – BEL333-12, BEL93-13, BEL98-13, BEL152-13, BEL153-13, BEL165-13), из зоны распростра-

нения метацентриков рас Białowieża и Киев (Хвоенск – BEL154-12, BEL62-13). Длина анализируемых последовательностей составила 953 нуклеотида (методику см. [28]). Для сравнения взяты 24 образца гена *cut b* *S. araneus*, депонированные в ГенБанке [28].

Хромосомные препараты приготовлены по стандартной методике [29], G-окраска хромосом проведена согласно M. Seabright [30].

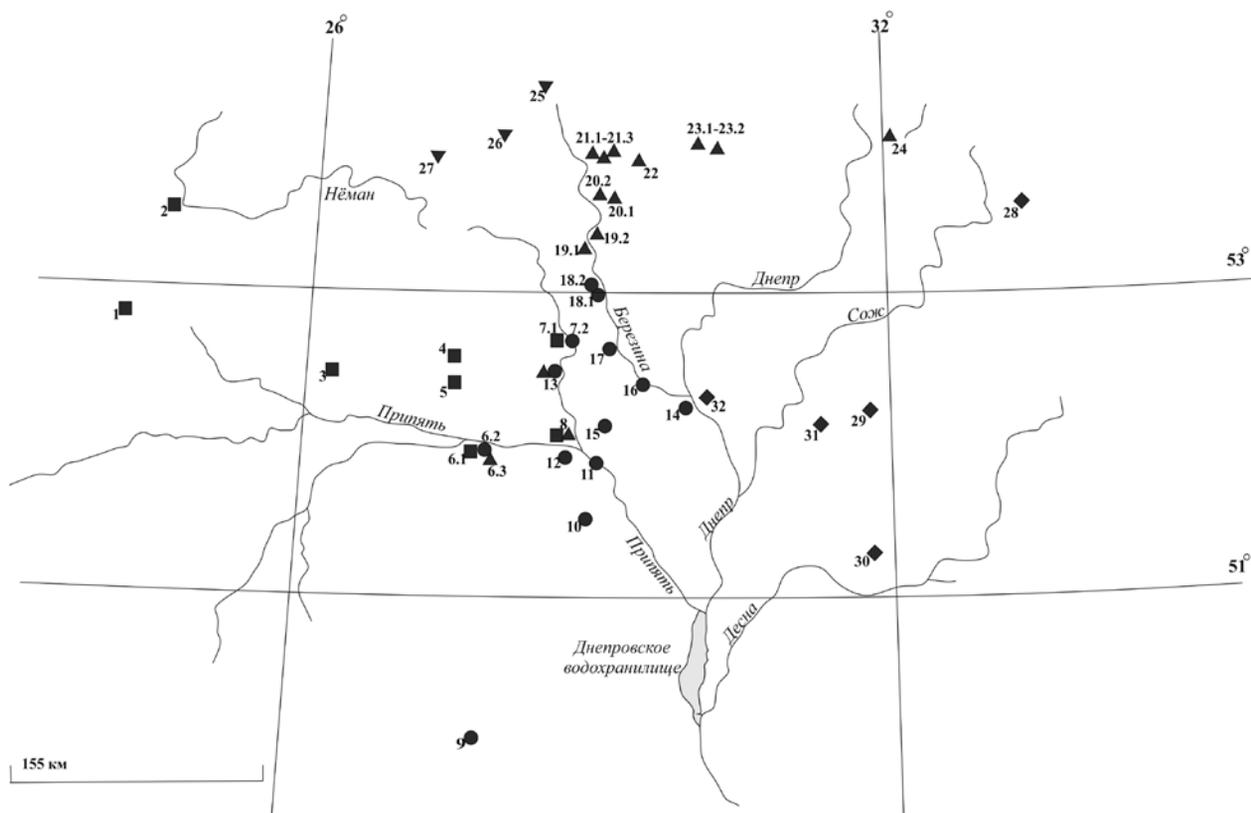


Рис. 1. Пункты отлова бурозубок с диагностическими хромосомами расы Białowieża (квадраты), расы Западная Двина (треугольники), расы Лепель (перевернутые треугольники), расы Нерусса (ромбы) и расы Киев (круги). Нумерация пунктов соответствует таблице

Хромосомы были идентифицированы в соответствии с международной номенклатурой хромосом *S. araneus* [31].

Все диагностические метацентрики и соответствующие им акроцентрики рассматривались как независимые локусы с 2 аллелями. При подсчете общей частоты диагностических метацентриков, специфических для определенной расы, за 1.0 принимали частоту, когда все диагностические метацентрики фиксированы в выборке.

Результаты и обсуждение

В результате анализа хромосомного полиморфизма *S. araneus* в бассейне нижней Березины и Припяти были выделены две группы популяций обыкновенной бурозубки. В первой группе распространены метацентрики хромосомной расы Białowieża (таблица, рис. 1: №№ 2–8), во второй – метацентрики расы Киев (табл., рис. 1: №№ 10–18).

Клиальная изменчивость частоты четырех метацентриков расы Białowieża, *gr*, *hn*, *ik*, *tr* [32], прослеживается от основного

ареала этой расы в Польше [27] до правобережья р. Березина. В Польше и западной Беларуси метацентрики *hn* и *ik* фиксированы, а частота акроцентрической формы хромосом *g*, *r* и *m*, *p* не превышает 0,01 и 0,05 соответственно [27] (см. табл.). Что касается популяций юго-восточной Беларуси, хромосомы *h*, *n* и *i*, *k* присутствуют как в акроцентрической, так и метацентрической форме, а метацентрики *gr* и *tr* встречаются с крайне низкой частотой [17] (табл.: №№ 5–7).

В полиморфных популяциях второй группы прослеживается клиальная изменчивость частот диагностических метацентриков расы Киев – *gm*, *hi* и *ko* [14]: частота метацентриков снижается с юга на север. Метацентрик *gm* встречается с низкой частотой на правом берегу р. Припять (табл.: №№ 11–13), а севернее р. Припять он не обнаружен (табл.: №№ 10–18). Метацентрик *hi*, полиморфный в изученных популяциях, фиксирован на территории Украины, основной части ареала расы Киев [14].

Однонаправленные клины метацентриков расы Западная Двина ранее были обнаружены в верхнем бассейне р. Березина [15, 16]. Хромосомная раса Западная Двина мономорфна по пяти Rb-транслокациям, *gm*, *hk*, *ip*, *no* и *qr*, на территории от Валдайской возв. до Смоленской возв. [18, 20]. Однако в популяциях этой расы южнее Смоленской возв. обнаружен полиморфизм по двум Rb-транслокациям (табл.: № 23), и частота метацентриков снижается в южном направлении (табл.: №№ 23–19) [16].

Особи с 10 парами акроцентрических диагностических хромосом в кариотипе были обнаружены в популяциях, относящихся к конечным частям клин трех рас (рис. 1: №№ 6–8, 13, 17, 19). В трех популяциях с низкой частотой метацентриков расы Białowieża были обнаружены кариотипы с метацентриками *hi* и *ko*, присущими расе Киев, и кариотипы с метацентриком *hk*, присущим расе Западная Двина (рис. 1: №№ 6–8, 13). Гибридные особи с метацентриками рас Białowieża и Киев (простая гетерозигота *h/n k/o* и комплексная гетерозигота *ik/ko*), были выявлены в двух пунктах (№№ 6, 7).

В двух выборках: из окр. Добруша и Речицкого р-на (левый берег Днепра, пункты №№ 31, 32) были зарегистрированы метацентрики *hi*, *kr* и *mn*, диагностические для расы Нерусса (*go*, *hi*, *kr*, *mn*, *pq*) [13]. Метацентриков *go* и *pq* в этих выборках не было обнаружено.

Бурозубки с метацентриками *gm*, *hk*, *ip* и *or*, отловленные в Воложинском р-не (табл., рис. 1: № 27), были отнесены к расе Лепель (*gm*, *hk*, *ip*, *nq*, *or*) [13]. Отловленные особи оказались гетерозиготами по транслокациям *gm*, *ip* и *or*, а плечи *n* и *q* у них были представлены акроцентриками.

Клины частот диагностических метацентриков трех хромосомных рас, Białowieża, Киев и Западная Двина, обнаруженные в бассейне Днепра и Припяти, представляют собой «множественные однонаправленные клины» по терминологии J. Searle и J. Wojcik [25]. Множественные конкордантные клины формируются при контакте хромосомных рас, когда одна из рас характеризуется несколькими метацентриками, отсутствующими у другой расы [25]. Приспособленность простых гетерозигот по Rb-транслокациям (в мейозе у них формируются триваленты, цепочки из трех хромо-

сом) существенно не отличается от приспособленности гомозигот по акроцентрическому и метацентрическому варианту хромосом [33]. Полиморфизм по Rb-транслокациям в случае однонаправленных клин может распространяться на расстояния около 100–150 км [15–17, 21, 22, 25].

Клиальная изменчивость прослеживается и в юго-западных популяциях расы Нерусса. Эта раса, как и Западная Двина, характеризуется мономорфным метацентрическим кариотипом на основной части ареала [19]. Акроцентрические морфы хромосомных плеч *g*, *o*, *k*, *r* и *p*, *q* отмечены лишь в окр. Новозыбкова (Брянская обл., Россия, на правом берегу р. Ипуть (приток р. Сож) вблизи границы России и Беларуси) [13], а в выборках из окр. Добруша и Речицкого р-на (левый берег Днепра) плечи *g*, *o* и *p*, *q* были представлены акроцентриками (табл.: №№ 29–32). Поскольку полиморфизм по транслокациям *go* и *pq* был обнаружен и южнее, на восточной территории Украины [14], можно предположить, что клина метацентриков расы Нерусса ориентирована вдоль русла Днепра.

Хромосомный полиморфизм присущ и расе Лепель. У бурозубки, отловленной в типовом местонахождении расы Лепель, были зарегистрированы три пары метацентриков, а бурозубки из Минской обл. оказались гетерозиготами по 4 транслокациям [13, 14]. В популяции из Воложинского р-на был выявлен полиморфизм по трем транслокациям, *gm*, *ip* и *or*, а метацентрика *nq* не было обнаружено (табл.: №№ 25–27). Однако крайне малый размер выборок не позволяет судить о градиенте частот метацентриков этой расы.

Практически во всех ранее изученных гибридных зонах с множественными однонаправленными клинами один или два метацентрика фиксированы. Например, в гибридных зонах расы Ulm и других рас, которые распространены в западной и центральной Европе [9, 21, 22, 23, 26], фиксированы метацентрики расы Ulm – *hi* и *gm*.

Ни один метацентрики не фиксирован в конечных и средних частях клин метацентриков рас Киев и Западная Двина в бассейне Днепра и Припяти. Подобная клиальная изменчивость объяснима, если предположить, что метацентрики разных рас распространились

по ареалу популяций с акроцентрическим кариотипом [16, 17]. Известны две хромосомные расы с акроцентрическим кариотипом, считающиеся исходным в эволюции *S. araneus*: Cordon в западных Альпах и Pelister на Балканах [8, 9, 10]. По-видимому, популяции с акроцентрическим кариотипом могли существовать и на территории нынешней Беларуси.

Территория в бассейне верхнего Днепра находилась в относительно благоприятных условиях во время максимальной стадии Валдайского оледенения (Last Glacial Maximum, LGM, 24–17 тыс. л. н.). Ледниковый покров и криогенные почвенные процессы отмечены только севернее, в бассейне Западной Двины [34]. Анализ местонахождений млекопитающих в LGM и на переходе от плейстоцена к голоцену свидетельствует о своеобразии фауны на этой территории бассейна Верхнего Днепра и о сходстве с фауной Уральских гор. Фауна в бассейне верхнего Днепра была отнесена к «уральскому варианту перигляциальной тундро-лесостепи» [24]. Местонахождения этого териокомплекса сконцентрированы только на среднем и Южном Урале. Видовой состав этого комплекса включал 30 видов разной экологической приуроченности, тундровых, степных и лесных, в некоторых местонахождениях этого териокомплекса были обнаружены ископаемые останки обыкновенной бурозубки. Фауна, обнаруженная на территориях западнее, южнее и восточнее бассейна верхнего Днепра, была отнесена к «перигляциальной тундро-лесостепной» [24].

Судя по хромосомному полиморфизму в современных популяциях, автохтонная акроцентрическая раса в ледниковую эпоху была распространена от Белорусской гряды до бассейна Припяти включительно и до бассейна р. Сож на востоке. Эти популяции акроцентрической расы во время Валдайского оледенения могли быть изолированы от популяций метацентрических рас, обитающих южнее и восточнее, сухими степными районами (по линии Львов–Киев–Калуга) [34]. При изменении климата в конце плейстоцена и начале голоцена ареал метацентрических рас расширился, и они вступили в контакт с акроцентрической расой на территории Беларуси. Клины частот метацентриков на территории Беларуси, свидетельствуют именно о вторичном контакте

ранее изолированных популяций. Восточная граница полиморфных по Робертсоновским соединениям популяций обыкновенной бурозубки проходит по Белорусской гряде (полиморфные популяции рас Зап. Двина) [16], бассейну р. Сож (полиморфные популяции расы Нерусса [13]). Отчетливо выраженная клина метацентриков расы Białowieża [17, наши данные] свидетельствует, что популяции с акроцентрическим кариотипом бассейна Верхнего Днепра были изолированы и с западной стороны. Причина этой изоляции остается неясной, но не исключено, что она также обусловлена сухими степными ландшафтами.

Лишь один факт заставляет задуматься об альтернативном объяснении хромосомного полиморфизма, наблюдаемого в междуречье Днепра и Припяти. Популяции, формирующие конечную часть клины расы Białowieża, контактируют с популяциями, в которых распространены диагностические хромосомы расы Киев (рис. 1: №№ 6, 7). В этой зоне контакта встречаются гибридные особи: простые и комплексные гетерозиготы. Именно в гибридных зонах между расами, различающимися по составу метацентриков, иногда наблюдается неожиданно высокая частота акроцентрических хромосом [35, 36]. Это явление, известное как «acroцентрический пик» [25], объясняется следующим образом. При скрещивании особей, различающихся по составу метацентриков, появляются комплексные гетерозиготы. В мейозе у комплексных гетерозигот образуются сложные конфигурации, кольца или цепочки, и их приспособленность ниже, чем приспособленность гомозигот и простых гетерозигот [33, 37, 38]. Под действием отбора частота комплексных гетерозигот снижается, а частота гомозигот по акроцентрикам и простых гетерозигот повышается. Так формируется акроцентрический пик [25, 34, 35].

Однако частотные клины метацентриков двух хромосомных рас в вышеупомянутых гибридных зонах с акроцентрическим пиком направлены навстречу друг другу [25, 35, 36]. В нашем случае снижение частоты метацентриков расы Киев происходит с юга на север, а не в сторону конечной части клины расы Białowieża. Конечная часть клины расы Киев находится в 70 км севернее пунктов, где обнаружены гибриды с метацентриками обеих рас.

Следовательно, встречно направленных (опозитных) клин, присущих гибридным зонам между метацентрическими расами [35, 36], в исследованных нами популяциях не было обнаружено.

Некоторые особенности полиморфных популяций на территории Беларуси не могут быть объяснены «acroцентрическим пиком». Так, в популяции с минимальной частотой метацентриков расы Białowieża встречаются не только метацентрики *hi* и *ko* (появление которых объясняется гибридизацией с расой Киев), но и метацентрик *hk* [14, 17] (рис. 1: №№ 6, 8, 13). Хромосомные расы Западная Двина и Лепель, которым присущ метацентрик *hk*, находятся значительно севернее от пунктов, где спорадически встречается метацентрик *hk* [13, 14, 16]. Проникновение метацентрика *hk* через территорию, на которой распространены метацентрики *hn* и *ik* расы Białowieża, представляется маловероятным.

Однако, если предположить, что метацентрики разных рас проникали с разных сторон на территорию, занятую популяциями с акроцентрическим кариотипом, симпатрическое распространение метацентриков неполной гомологии при их низкой частоте вероятно. Когда частота какого-либо метацентрика повышается, метацентрики неполной гомологии элиминируются из популяции. Метацентрик *hk* мог сохраниться в популяциях, где частота метацентриков расы Białowieża *hn* и *ik* очень низка.

При сравнении частотных клин метацентриков одной расы видно, что расстояние проникновения разных метацентриков неодинаково. Метацентрики расы Западная Двина *gm* и *hk* проникают дальше на юг, чем *ip* и *qr*, метацентрики *hi* и *ko* расы Киев – дальше на север, чем метацентрик *gm*, а метацентрики *hn* и *ik* расы Białowieża – дальше на восток, чем метацентрики *gr* и *mp* (рис. 1). Объяснить это явление отбором против комплексных гетерозигот, по аналогии с гибридными зонами метацентрических рас [35], вряд ли возможно.

Хромосомные расы Białowieża (*gr*, *hn*, *ik*, *mp*) и Киев (*gm*, *hi*, *ko*) различаются по трем метацентрикам неполной гомологии. При скрещивании особей расы Киев (*gm*, *hi*, *ko*) с особями-носителями метацентриков *gr* и *mp* вероятность появления комплексных гетерозигот не больше, чем при скрещивании с носи-

телями метацентриков *hn* и *ik*. Таким образом, нет видимой причины, чтобы метацентрики *gr* и *mp* элиминировались бы в гибридной зоне рас Киев и Białowieża в большей степени, чем метацентрики *hn* и *ik*. Следовательно, можно предположить, что неодинаковое распространение метацентриков обусловлено другими факторами, например, экологическими.

Плечи метацентрических хромосом и гомологичные им акроцентрические хромосомы, идентичные по дифференциальной G-окраске, могут отличаться особенностями генных комплексов. Эти генные комплексы могут оказывать селективно нейтральными или оказывать влияние на приспособленность. В результате анализа частоты акроцентрической и метацентрической морфы хромосом *m* и *p* в популяциях расы Białowieża было обнаружено, что частота этих морф в разных биотопах неодинакова [27]. При исследовании физиологических параметров особей, гомозиготных и гетерозиготных по транслокации *mp*, оказалось, что уровень метаболизма у гетерозигот выше, чем у гомозигот [39]. Эти факты косвенно свидетельствуют в пользу нашего предположения о том, что распространение метацентрика *mp* на меньшее расстояние по сравнению с метацентриками *hn* и *ik* обусловлено условиями окружающей среды.

В полученных последовательностях гена *cut b* было обнаружено 12 (1,3%) переменных позиций. Все замены были синонимичными и являлись транзициями. Гаплотипическое разнообразие выборки белорусских бурозубок составило $0,733 \pm 0,124$, нуклеотидное разнообразие – $1,98 \pm 1,34 \times 10^3$.

В исследуемой выборке 5 особей имели т.н. «центральный» гаплотип, часто встречающийся во многих хромосомных расах обыкновенной бурозубки (расположен в центре медианной сети филогенетических отношений между гаплотипами гена *cut b* (рис. 2)). Таким образом, в исследуемой выборке обыкновенной бурозубки Беларуси филогеографическая подразделенность не выражена и не определялась кариологическими особенностями. Анализ исследованных выборок показал среднее гаплотипическое разнообразие при относительно низком нуклеотидном, что также отмечалась в различных исследованиях мтДНК обыкновенной бурозубки [28, 40].

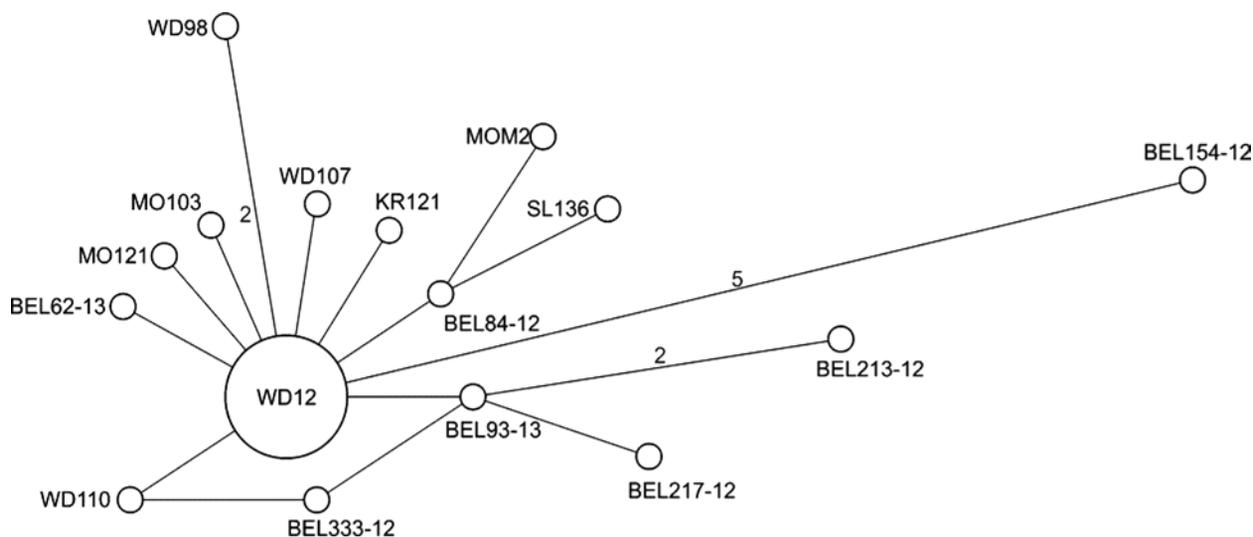


Рис. 2. Медианная сеть митохондриальных гаплотипов исследованной выборки *Sorex araneus*. Размер круга пропорционален числу гаплотипов. Расстояния между кругами пропорциональны числу мутаций (отмечены цифрами, если количество больше одной)

Заключение

Все вышеперечисленные данные свидетельствуют в пользу ранее высказанной гипотезы о существовании акроцентрической расы в бассейне Днепра и Припяти в плейстоцене. Вероятно, в плейстоцене эта раса была изолирована от метацентрических рас сухими степными районами. В конце плейстоцена – начале голоцена, в результате потепления и восстановления единого ареала обыкновенной бурозубки, метацентрические расы вступили в контакт с акроцентрической расой. В результате гибридизации между автохтонной акроцентрической расой и метацентрическими расами Виаłowieża, Западная Двина, Нерусса и Киев, проникающими на эту территорию в послеледниковье, сформировались клины метацентриков.

Бурозубки с кариотипом, идентичным кариотипу предковой расы (с 10 парами акроцентрических диагностических хромосом), обнаружены в конечных областях трех клин метацентриков. При этом, ни в одном из изученных пунктов не было обнаружено популяции с акроцентрическим кариотипом. Вероятно, распространение метацентриков по ареалу предковой акроцентрической расы привело к ее исчезновению. Этот факт согласуется с общепринятой точкой зрения, что уменьшение числа хромосом представляет собой основную тенденцию в эволюции кариотипа

S. araneus [25]. Таким образом, клинальная изменчивость метацентриков на территории Беларуси не связана с ныне существующими гибридными зонами, а возникла в результате гибридизации в прошлом.

Работа выполнена при финансовой поддержке международного проекта РФФИ (14-04-90006 «Бел-а») и БРФФИ (Б14Р-134).

Список использованных источников

1. Avise, J.C. Molecular markers, natural history and evolution. – New-York: Chapman & Hall, 1994. – P. 511.
2. Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization / D.T. Bilton [et al.] // Proc. R. Soc. Lond. B. – 1998. – Vol. 265. – P. 1219–1226.
3. Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) / V. Deffontaine [et al.] // Molecular Ecology. – 2005. – Vol. 14. – P. 1727–1739.
4. Definition and nomenclature of the chromosome races of *Sorex araneus* / J. Hausser [et al.] // Folia Zool. – 1994. – Vol. 43, Suppl. 1. – P. 1–9.
5. The list of the chromosome races of the common shrew *Sorex araneus* (updated 2002) / J.M. Wójcik [et al.] // Mammalia. – 2003. – Vol. 67. – P. 169–178.

6. Обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus*) – модельный вид эколого-эволюционных исследований / Н.А. Щипанов [и др.] // Зоологич. журн. – 2009. – Т. 88, № 8. – С. 975–989.
7. Иерархия внутривидовых таксонов обыкновенной бурозубки, *Sorex araneus* (Insectivora), и таксономическая структура вида млекопитающих / В.Н. Орлов [и др.] // Зоол. журн. – 2004. – Т. 83, № 2. – С. 199–212.
8. Karyotypic and biochemical status of certain marginal populations of *Sorex araneus* / J. Zima [et al.] // Folia Zool. – 1994. – Vol. 43, Suppl. 1. – P. 43–51.
9. Relationships between chromosome races and species of *Sorex* of the *araneus* group in the western Alps / J. Hausser [et al.] // Mem. Soc. Vaud. Sci. Natur. – 1991. – Vol. 19. – P. 79–95.
10. Karyological and allozyme survey of the common shrew *Sorex araneus* from Macedonia / M. Macholan [et al.] // Zeits. Zoolog. Sauget. Syst. Evolution. – 1994. – Vol. 32. – P. 129–136.
11. Процессы фиксации метацентрических хромосом в популяциях обыкновенной бурозубки, *Sorex araneus* L., Восточной Европы / В.Н. Орлов [и др.] // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 5. – С. 581–593.
12. Эволюция хромосом обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. на Южном Урале и в Сибири в послеледниковый период / А.В. Поляков [и др.] // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 4. – С. 448–455.
13. The diversity of chromosome races in *Sorex araneus* from European Russia / N.S. Bulatova [et al.] // Acta Theriol. – 2000. – Vol. 45, Suppl. 1. – P. 33–46.
14. Mishta, A.V. Karyotypic variation of the common shrew *Sorex araneus* in Belarus, Estonia, Latvia, Lithuania and Ukraine / A.V. Mishta, J.B. Searle, J.M. Wójcik // Acta Theriol. – 2000. – Vol. 45, Suppl. 1. – P. 47–58.
15. Орлов, В.Н. Филогенетические связи обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus* L., Insectivora) в Белоруссии по кариологическим данным / В.Н. Орлов, Ю.М. Борисов // Зоол. журн. – 2009. – Т. 88, № 12. – С. 1506–1514.
16. Borisov, Yu.M. A wide hybrid zone of chromosome races of the common shrew, *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 (Mammalia), between the Dnieper and Berezina Rivers (Belarus) / Yu.M. Borisov, E.V. Cherepanova, V.N. Orlov // Compar. Cytogenet. – 2010. Vol. 3, No. 2. – P. 195–201.
17. Chromosomal polymorphism of populations of the common shrew, *Sorex araneus* L., in Belarus. / Yu.M. Borisov [et al.] // Acta Theriol. – 2014. – Vol. 59, Suppl. 2. – P. 243–249.
18. Булатова Н.Ш., Внутривидовые филогенетические связи у *Sorex araneus* L.: южнобалтийская подгруппа хромосомных рас / Н.Ш. Булатова, Р.С. Наджафова, Т.П. Крапивко // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 1. – С. 79–85.
19. New data on the geographic distribution of chromosome races of *Sorex araneus* (Soricidae, Eulipotyphla) in European Russia / N.V. Bystrakova [et al.] // Russian J. Theriol. – 2007. – Vol. 6, No. 1. – P. 105–109.
20. Контакты хромосомных рас обыкновенной бурозубки, *Sorex araneus* L. (Insectivora, Mammalia), на краевых образованиях вепсовской стадии Валдайского ледника / Ю.М. Борисов [и др.] // Сибирский экологический журнал. – 2008. – Т. 15, № 5. – С. 583–589.
21. Lukáčová, L. A hybrid zones between the Ulm and Drnholec karyotypic races of *Sorex araneus* in the Czech Republic / L. Lukáčová, J. Pialec, J. Zima, // Folia Zool. – 1994. – Vol. 43, Suppl. 1. – P. 37–42.
22. New *Sorex araneus* karyotypes from Germany and the postglacial recolonization of Central Europe / H. Brünner [et al.] // Acta Theriol. – 2002. – Vol. 47, Suppl. 3. – P. 277–293.
23. Zima, J. New data on karyotypic variation in the common shrew, *Sorex araneus*, from the Czech Republic: an extension of the range of the Laska race / J. Zima, L. Slivková, L. Tomášková // Mammalia. – 2003. – Vol. 68, No. 2. – P. 209–215.
24. Эволюция экосистем Европы при переходе от плейстоцена к голоцену (24–8 тыс. л. н.) / А.К. Маркова [и др.]. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 556 с.
25. Searle, J.B. Chromosomal evolution: The case of *Sorex araneus* / J.B. Searle, J.M. Wójcik // Evolution in the Shrews. – Białowieza: Mammal. Research Inst. Polish Acad. Sci. – 1998. – P. 219–268.
26. Hausser, J. Distribution of two karyotypic races of the *Sorex araneus* L. (Insectivora, Soricidae) in Switzerland and the post-glacial recolonization of the Valais: First results / J. Hausser, E. Dannelid, F. Catzeflis // Zeits. Zoologische Syst. Evolution. – 1986. – Vol. 24. – P. 307–314.

27. Wójcik, J.M. Chromosome and allozyme variation of the common shrew, *Sorex araneus*, in different habitats / J.M. Wójcik, A.M. Wójcik, H. Zalewska // *Hereditas*. – 1996. – Vol. 125. – P. 183–189.
28. Генетическая структура обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. 1758 (Mammalia, Lipotyphla) на сплошных и фрагментированных участках ареала / О.О. Григорьева [и др.] // *Генетика*. – 2015. – Т. 51. – № 6. С. 711–723.
29. Ford, C. A colchicine hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes / C. Ford, J. Hamerton // *Stain Technol.* – 1956. – Vol. 31. – P. 247–251.
30. Seabright, M. A rapid banding technique for human chromosomes / M. Seabright // *Lancet*. – 1971. – Vol. 11. – P. 971–972.
31. Nomenclature for the chromosomes of the common shrew (*Sorex araneus*) / J.B. Searle [et al.] // *Mém. Soc. Vaud. Sci. Nat.* – 1991. – Vol. 19. – P. 13–22.
32. Fredga, K. Karyotype variability in *Sorex araneus* L. (Insectivora, Mammalia) / K. Fredga, J. Nawrin // *Chromosomes Today*. – 1977. – Vol. 6. – P. 153–161.
33. Searle, J.B. Meiotic study of of Robertsonian heterozygotes from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus* L. / J.B. Searle // *Cytogenet Cell Genet.* – 1986. – Vol. 41. – P. 154–162.
34. Развитие ландшафтов и климата Северной Евразии: Поздний плейстоцен-голоцен / А.А. Величко [и др.]. – М.: Наука, 1993. – С. 11–20.
35. Searle, J.B. Factors responsible for a karyotypic polymorphism in the common shrew, *Sorex araneus* / J.B. Searle // *Proc. R. Soc. Lond.* – 1986. – B. 229. – P. 277–298.
36. Fedyk, S. Genetic differentiation of Polish populations of *Sorex araneus* L. II. Possibility of gene flow between chromosome races / S. Fedyk // *Bul. Polish Acad. Sci. Biol Sci.* – 1986. – Vol. 34, Nos 7–9. – P. 161–171.
37. Reassessment of the Drngholec race: studies on meiosis in *Sorex araneus* hybrids / S. Fedyk [et al.] // *Acta Theriol.* – 2000. – Vol. 54, Suppl. 1. – P. 59–67.
38. Jadwiszczak, K.A. Fertility in the male common shrews, *Sorex araneus*, from the extremely narrow hybrid zone between chromosomal races / K.A. Jadwiszczak, A. Banaszek // *Mammal. Biol.* – 2006. Vol. 71. – P. 257–267.
39. Robertsonian polymorphism in the common shrew (*Sorex araneus* L.) and selective advantage of heterozygotes indicated by their higher maximum metabolic rates / A. Banaszek [et al.] // *Heredity*. – 2009. – Vol. 102. – P. 155–162.
40. The evolutionary history of the two karyotypic groups of the common shrew, *Sorex araneus*, in Poland / M. Ratkiewicz [et al.] // *Heredity*. – 2002. – Vol. 88, No. 4. – P. 235–242.

Дата поступления статьи 1 мая 2015 г.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ЖЕРЕБЦОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ДОПУСТИМЫХ УРОВНЕЙ МИКОТОКСИНОВ КОРМА

Институт животноводства Национальной академии аграрных наук Украины,
Украина, 61026, г. Харьков, ул. 7-й Гвардейской Армии, 3

Введение

Известно, что в последние годы агрессивность окружающей среды возросла. На этом фоне регистрируется увеличение онкологических и аллергических заболеваний, снижение репродуктивной функции как у людей, так и у животных [1–4]. Многие исследователи сходятся во мнении, что в основе этих процессов лежат изменения генетического аппарата под влиянием мутагенных и канцерогенных свойств всевозможных химических веществ и соединений как искусственного, так и естественного происхождения. Накапливаясь в организме животного на протяжении всей его жизни, они могут увеличивать количество хромосомных, генных или геномных мутаций, что может способствовать развитию различных заболеваний и снижению репродуктивной функции [5]. В животноводстве особое внимание уделяется репродуктивной функции, особенно в коневодстве, так как лошадь является одноплодным животным с большим интервалом между поколениями. В отрасли коневодства Украины выход жеребят на начало 2014 года составлял всего 48%. Естественно, что первоочередной научно-практической задачей является увеличение выхода жеребят. Для решения данной задачи необходимо сначала изучить влияние факторов, которые могут влиять на генетический аппарат. В Украине проводились отдельные цитогенетические исследования лошадей в связи с репродуктивной функцией, но при этом не изучалось влияние микотоксинов на цитогенетический статус [6].

Из природных веществ мутагенными и канцерогенными свойствами обладают микотоксины, которыми сильно поражены корма для лошадей в Украине и во всем мире [7–8]. Из литературных данных известна способность микотоксинов накапливаться в организме и индуцировать развитие субклинических, хронических

заболеваний. У лошадей изучены лишь острые микотоксикозы, а хронические остаются практически неизученными как в Украине, так и в мире [9]. Если мутагенные свойства высоких доз микотоксинов не вызывают сомнений, то как будут влиять допустимые концентрации микотоксинов корма на хромосомный аппарат лошадей в Украине, практически неизвестно. Поэтому, определенное значение приобретают исследования влияния максимально допустимых уровней микотоксинов корма на цитогенетический статус лошадей в целом и жеребцов-производителей в частности. Жеребцы-производители оказывают большое влияние на ту или иную популяцию, так как одним жеребцом за случной сезон покрывают в среднем около сорока кобыл и более. Это может способствовать как снижению выхода жеребят от ненаследуемых хромосомных аномалий, которые могут накапливаться на протяжении жизни производителя, так и распространению сбалансированных наследуемых цитогенетических дефектов, особенно если сперму жеребца используют в системе искусственного осеменения.

Ввиду того, что данная проблема требует особого внимания, целью нашей работы является установление влияния максимально допустимых концентраций микотоксинов корма на цитогенетический статус жеребцов-производителей заводских пород Украины.

Материалы и методы

Исследование выполняли в Украине на 7 жеребцах-производителях украинской верховой породы Харьковского конного завода, 6 жеребцах-производителях тракененской породы и 3 жеребцах-производителях арабской породы Чутовского конного завода «Тракен» Полтавской области, на 5 жеребцах-производителях вестфальской породы Петрековского конного

завода Днепропетровской области. Контаминацию кормов микотоксинами определяли на базе лаборатории микотоксикологии Института животноводства Национальной академии аграрных наук Украины (ИЖ НААН) до и после поступления кормов с микотоксинами. До начала опыта жеребцы получали качественные нетоксичные корма без микотоксинов на протяжении 4–6 месяцев, что подтверждалось проведением ежемесячного комплексного исследования грубых и концентрированных кормов, в том числе и проведением токсикологических исследований. Затем в хозяйства были завезены партии концентрированных кормов с максимально допустимыми концентрациями микотоксинов (до 0,1 мг/кг Т-2 токсина, 0,08–1,0 мг/кг зеараленона, до 1,0 мг/кг дезоксиниваленола, 0,04 мг/кг афлатоксина), концентрация которых подтверждалась ежемесячными исследованиями. Так как выявленные уровни микотоксинов являются допустимыми для кормления животных в Украине, то владельцы лошадей приняли решение задавать такие корма в тех же количествах, что и свободные от микотоксинов корма. Корма с допустимыми концентрациями микотоксинов задавались лошадям ежедневно на протяжении 8 месяцев. Цитогенетические исследования жеребцов выполняли до и после получения корма с максимально допустимыми уровнями микотоксинов на базе лаборатории генетики ИЖ НААН с помощью анализа метафазных пластинок лимфоцитов крови [10]. Кровь

жеребцов для цитогенетических исследований отбирали до и после получения кормов с микотоксинами один раз в неделю общепринятыми методами из яремной вены с соблюдением правил асептики и антисептики в стерильные пробирки с гепарином. В стерильных условиях лаборатории проводили постановку культуры лимфоцитов с добавлением среды Игла или среды 199, инактивированной сыворотки теленка, фитогемагглютинаина и антибиотиков при 37 °С на протяжении 48–72 часов, после чего приготавливались препараты метафазных пластинок лимфоцитов крови; в каждой пробе крови анализировали не менее 50 метафазных пластинок [10]. На рисунке представлен физиологический кариотип и патологические участки метафазных пластинок.

Статистическую обработку результатов проводили как общепринятыми методиками [11], так и с применением специализированной программы SPSS.

Результаты и обсуждение

Наши предыдущие исследования доказали негативное влияние максимально допустимых уровней микотоксинов корма на биотехнологическую пригодность спермы жеребцов, результативность случки и искусственного осеменения, гематологические и биохимические показатели организма жеребцов и кобыл, а также на показатели специфической и неспецифической резистентности лошадей.

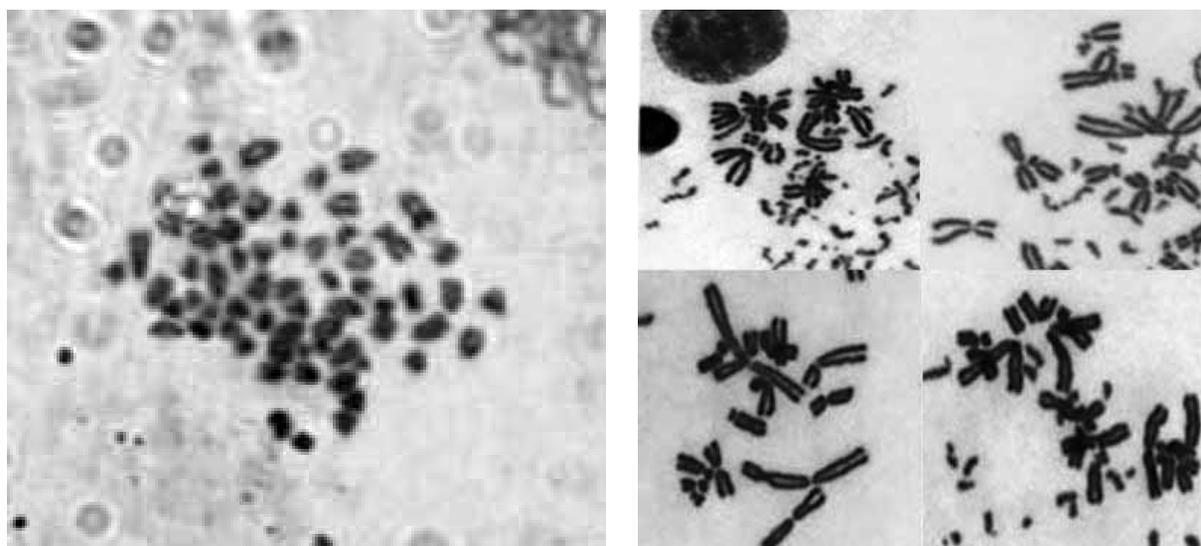


Рисунок. Физиологический кариотип (слева) и патологические участки метафазных пластинок после получения корма с микотоксинами (справа)

Логическим продолжением вышеуказанных исследований является изучение влияния максимальных допустимых уровней микотоксинов корма на те цитогенетические показатели, которые имели достоверное влияние на биотехнологическую при-

годность спермы жеребцов в ранее проведенных нами работах. В таблице представлены данные по цитогенетическим показателям производителей под влиянием допустимых концентраций зеараленона, Т-2 токсина, дезоксиниваленола и афлатоксина.

Цитогенетический статус жеребцов обследованных пород до и после получения корма с допустимым уровнем микотоксинов ($M \pm m$; $n = 35$)

Показатель	Порода жеребцов			
	Украинская верховая	Тракененская	Арабская	Вестфальская
До получения корма с допустимым уровнем микотоксинов				
Общее количество обследованных метафаз	1918	2015	1834	1914
Среднее количество метафаз на 1 пробу	54,8±0,77	54,5±0,82	52,4±0,75	55,0±0,85
Количество метафаз с аберрациями	3,1±0,34	2,6±0,11	2,5±0,17	2,6±0,10
Относительное количество метафаз с аберрациями, %	5,8±0,63	4,7±0,21	4,8±0,35	4,7±0,19
Всего аберраций	3,2±0,33	2,6±0,11	3,6±0,27	3,8±0,17
Аберраций на 100 клеток	5,9±0,62	4,7±0,21	6,9±0,57	7,0±0,32
Единичные фрагменты	2,2±0,18	1,8±0,11	2,8±0,20	2,7±0,14
Единичные фрагменты, %	76,4±3,65	71,4±3,91	79,8±6,04	73,0±3,91
Парные фрагменты	0,9±0,21	0,7±0,10	0,6±0,21	0,8±0,12
Парные фрагменты, %	21,6±4,62	26,4±4,11	15,7±5,80	18,8±3,19
Кольцевые хромосомы	0,14±0,16	0,1±0,18	0,2±0,30	0,4±0,16
Кольцевые хромосомы, %	2,4±2,74	3,3±5,87	4,5±6,76	8,2±3,75
Пробелы	0,0	0,1±0,18	0,2±0,30	0,2±0,19
Пробелы, %	0,0	3,3±5,87	5,8±8,81	3,2±3,74
После получения корма с допустимым уровнем микотоксинов				
Общее количество обследованных метафаз	1920	2012	1831	1917
Среднее количество метафаз на 1 пробу	54,8±0,77	54,5±0,82	52,4±0,75	55,0±0,85
Количество метафаз с аберрациями	4,5±0,41*	3,4±0,12***	3,2±0,13**	3,2±0,09***
Относительное количество метафаз с аберрациями, %	8,2±0,77*	6,3±0,22***	6,2±0,31**	5,9±0,17***
Всего аберраций	4,2±0,35*	3,2±0,13***	5,7±0,26***	6,12±0,27***
Аберраций на 100 клеток	7,7±0,66	5,9±0,25***	10,9±0,50***	11,2±0,50***
Единичные фрагменты	1,5±0,13**	0,7±0,11***	2,1±0,18*	1,7±0,13***
Единичные фрагменты, %	43,9±3,95***	22,2±3,49***	37,1±3,02***	27,6±1,60***
Парные фрагменты	1,1±0,09	1,0±0,06**	1,5±0,17**	1,9±0,13***
Парные фрагменты, %	28,9±2,83	33,9±2,07	26,1±2,47	31,1±2,11**
Кольцевые хромосомы	0,8±0,21*	0,9±0,07***	1,1±0,10*	1,6±0,15***
Кольцевые хромосомы, %	14,2±3,08**	30,6±2,54***	19,3±1,22	26,6±2,16***
Пробелы	0,7±0,23	0,6±0,15*	1,0±0,16*	1,0±0,16**
Пробелы, %	13,0±4,04	18,1±4,25	17,6±2,41	15,3±2,29*

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Из данных таблицы видно, что до получения корма с максимально допустимым уровнем зеараленона, Т-2 токсина, дезоксиниваленола и афлатоксина процент метафаз с абберациями у жеребцов тракененской, арабской и вестфальской пород в среднем находился примерно на одном уровне и не превышал 5%, процент метафаз с абберациями у жеребцов украинской верховой породы в среднем был выше 5% на 0,76%. Общее количество аббераций в среднем было наибольшим у производителей вестфальской породы, что на 16,7% больше украинской верховой породы, на 33,1% больше ($p < 0,001$) тракененской породы и на 6,3% больше жеребцов арабской породы. В перерасчете на сто клеток в среднем наименьшее количество аббераций было установлено у тракененской породы, что на 24,2% меньше ($p < 0,001$) украинской верховой породы, на 47% меньше ($p < 0,001$) арабской породы и на 48,5% меньше ($p < 0,001$) вестфальской породы. Среди исследуемых пород на долю единичных фрагментов в среднем приходилось более 70%. Относительное количество парных фрагментов в среднем не превышало 27%, а кольцевых хромосом – не более 9%. Относительное количество пробелов в среднем колебалось от нуля у украинской верховой породы до 5,8% у арабской породы.

После получения корма с максимально допустимым уровнем микотоксинов процент метафаз с абберациями у исследуемых производителей в среднем увеличился у украинской верховой породы на 2,4% ($p < 0,05$), тракененской породы – на 1,6% ($p < 0,001$), арабской породы – на 1,4% ($p < 0,01$), вестфальской породы – на 1,2% ($p < 0,001$). Общее количество аббераций у жеребцов вестфальской породы в среднем увеличилось на 37,7% ($p < 0,001$), у арабской породы – на 36,8% ($p < 0,001$), у тракененской породы – на 18,8% ($p < 0,001$), у украинской верховой – на 23,8%. Наблюдалось перераспределение спектра аббераций хромосом. Относительное количество единичных фрагментов у исследуемого поголовья уменьшилось в среднем у украинской верховой породы на 32,5% ($p < 0,001$), у тракененской породы – на 49,2% ($p < 0,001$), у арабской породы – на 42,7% ($p < 0,001$), у вестфальской породы – на 45,4% ($p < 0,001$). Хотя были жеребцы у которых преобладало увеличение количества единичных фрагментов. Следователь-

но, можно предположить, что под длительным действием максимально допустимых уровней микотоксинов корма хромосомные изменения могут иметь индивидуальный характер. У исследуемых жеребцов увеличилось абсолютное и относительное количество парных и кольцевых фрагментов, а также пробелов. Относительное количество парных фрагментов у исследуемого поголовья увеличилось в среднем у украинской верховой породы на 7,3%, у тракененской породы – на 7,5%, у арабской породы – на 10,4%, у вестфальской породы – на 12,3% ($p < 0,01$). Относительное количество кольцевых хромосом у исследуемых пород увеличилось в среднем у украинской верховой породы на 11,8% ($p < 0,01$), у тракененской породы – на 27,3% ($p < 0,001$), у арабской породы – на 14,8%, у вестфальской породы – на 18,4% ($p < 0,001$). Увеличился в среднем процент пробелов у украинской верховой породы на 13,0% ($p < 0,01$), у тракененской породы – на 14,8%, у арабской породы – на 11,8%, у вестфальской породы – на 12,1% ($p < 0,05$).

Корреляционно-дисперсионный анализ показал, что степень влияния породы и индивидуального фактора на процент метафаз с абберациями среди исследуемого поголовья после хронического микотоксикоза составляет соответственно 10,8% ($p < 0,01$) и 89,4% ($p < 0,001$), что подтверждает ранее высказанное нами предположение о роли индивидуального фактора в характере хромосомных изменений.

Мутагенный эффект допустимых уровней микотоксинов корма при кормлении лошадей начинал регистрироваться в зависимости от индивидуальной чувствительности у большинства (57%) обследованных жеребцов через 8–9 недель, а у остальных особей – в интервале от 2 до 7 месяцев непрерывного кормления.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при кормлении лошадей исследуемых пород кормом с максимально допустимыми уровнями микотоксинов мутагенный эффект начинает наблюдаться в интервале от 8–9 недель до 7 месяцев.

Заключение

Впервые в Украине проведены исследования влияния максимально допустимых уровней зеараленона, Т-2 токсина, дезоксиниваленола и афлатоксина корма на цитогенетические

показатели жеребцов-производителей украинской верховой, траккененской, арабской и вестфальской пород. После кормления жеребцов кормом с максимально допустимыми уровнями микотоксинов у исследуемого поголовья наблюдалось достоверное увеличение относительного количества метафаз с аберрациями в среднем у украинской верховой породы на 2,4% ($p < 0,05$), траккененской породы – на 1,6% ($p < 0,001$), арабской породы – на 1,4% ($p < 0,01$), вестфальской породы – на 1,2% ($p < 0,001$). При этом общее количество аберраций у жеребцов вестфальской породы в среднем увеличилось на 37,7% ($p < 0,001$), у арабской породы – на 36,8% ($p < 0,001$), у траккененской породы – на 18,8% ($p < 0,001$), у украинской верховой – на 23,8%. Таким образом, полученные данные позволяют говорить о необходимости ограничения сроков кормления жеребцов-производителей исследуемых пород кормом с максимально допустимыми уровнями микотоксинов в связи с их мутагенным эффектом.

Список использованных источников

1. Коваленко, М.А. Способы прогнозирования канцерогенных свойств факторов окружающей среды / М.А. Коваленко // Охрана окружающей среды, 2005. – № 4. – С. 30–32.
2. Патогенетические эффекты нестабильности эмбрионального генома в развитии человека / И.Н. Лебедев [и др.] // Вестник ВОГиС, 2006. – Т. 10. – № 6. – С. 520–529.
3. Dean, W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer / W. Dean, F. Santos, W. Reik // Seminars in Cell and Developmental Biol, 2003. – Vol. 14. – P. 93–100.
4. Метод ДНК-комет в выявлении геномной нестабильности. Мониторинг состояния генома у работников ОАО «МАЗ» / Н.В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск: Право и экономика, 2008. – С. 108–114.
5. Микотоксины и микотоксикозы / под. ред. Д. Диаза. – Москва: Печатный город, 2006. – 384 с.
6. Шельов, А.В. Цитогенетичні дослідження в тваринництві / А.В. Шельов // Матеріали ювілейної науч. конф. студентів, аспірантів і молодих учених, посвященної 180-летию со дня рожд. Л.С. Ценковського, г. Одесса, 28 марга-1 апреля 2003 г. – Одесса, 2003. – С. 192.
7. Брезвин, О. Контроль мікотоксинів у кормах і їх знешкодження / О. Брезвин, В. Отчич, І. Коцюмбас // Вісник Львівського університету. – Львів, 2013. – Випуск 62. – С. 242 – 249.
8. Цвіліховський, В.І. Стан і безпека кормів та кормової сировини за показниками забрудненості мікотоксинами в тваринницьких господарствах України / В.І. Цвіліховський, О.А. Лапоша, А.В. Белоцька // Біологія тварин. – Львів, 2010. – Т. 12. – № 1. – С. 145–150.
9. Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm / A. Filannino [et al.] // Reproductive Biology and Endocrinology, 2011. – Vol. 9. – P. 134–140.
10. Исследование хромосом сельскохозяйственных животных: методические рекомендации / под. ред. А.Ф. Яковлева. – Ленинград. – 1976. – 65 с.
11. Плохинский, Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н.А. Плохинский. – М.: Колос, 1969. – 256 с.

Дата поступления статьи 23 марта 2015 г.

МЕЖПОРОДНЫЙ СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИИ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА С ПРИЗНАКАМИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ У КОРОВ ГОЛШТИНСКОЙ И ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОД

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

Введение

Современные ДНК-технологии, такие, как маркер-сопутствующая селекция, позволяют ускорить темпы селекции и сократить финансовые затраты при осуществлении классических селекционных мероприятий. Однако отбор животных с предпочтительными генотипами, ассоциированными с признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота, против ожидания, не во всех случаях приносит такой значительный и скорый результат. Многие авторы обращают внимание на необходимость совершенствования способов оценки фенотипических эффектов генетических маркеров [1–3]. Поэтому особый интерес представляет разработка методов оценки ассоциации полиморфных генов-кандидатов с количественными хозяйственно-полезными признаками.

Исследования ассоциации полиморфных генов-кандидатов с признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота в настоящее время сводятся, в основном, к определению предпочтительного аллеля и генотипа путем сравнения между собой показателей продуктивности у животных с разными генотипами [2, 4–5]. Данный подход позволяет выявить генотипы, характеризующиеся повышенным и пониженным уровнем продуктивности по исследуемому признаку, однако он не отражает степень их превосходства в показателях продуктивности по отношению ко всему исследуемому поголовью. Поэтому мы предложили общепринятый сравнительный анализ генотипов между собой дополнить оценкой фенотипического эффекта предпочтительного и нежелательного генотипов по отношению к уровню продуктивности общей выборки [6, 7]. Это позволило сопоставить и оценить количественно степень проявления

повышающих эффектов для предпочтительных генотипов и понижающих эффектов для нежелательных генотипов. Ранее, в ходе исследований полиморфных генов-кандидатов, принадлежащих к группе соматотропинового каскада, нами было показано, что, во-первых, продуктивность животных с предпочтительным и нежелательным генотипом может находиться в пределах среднего значения по общей выборке. В таком случае селекционный отбор животных с предпочтительным генотипом будет недостаточно эффективен. Во-вторых, были установлены случаи, когда один и тот же генотип у представителей голштинской породы и белорусской черно-пестрой обладал противоположным эффектом на признак белковомолочности [8, 9].

В настоящее время выявлено большое количество потенциальных генов-кандидатов, полиморфные варианты которых ассоциированы с признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота. Целью данного исследования было оценить ассоциацию полиморфных вариантов гена каппа-казеина с признаками удоя за 305 суток и белковомолочности (молочный белок, кг, за 305 суток лактации) с применением ранее разработанного подхода.

Казеин является основным белком молока, представленным в нем в нескольких формах – α , β , γ и др. Показателем, который в наибольшей степени отличает одну форму казеина от другой, является содержание фосфора. Наибольшее количество фосфора выявлено в α -казеине (1%) и в 10 раз меньше в γ -казеине (0,1%).

Ген *CSN3*, кодирующий белок каппа-казеин, локализован в шестой хромосоме, имеет размер 13 т.п.о. и состоит из 5 экзонов и 4 интронов [10].

На сегодняшний день описано семь аллелей гена *CSN3*: А, В, С, D, E, F, G, H. Наиболее часто у крупного рогатого скота (КРС) встречаются А и В аллельные варианты каппа-казеина, отличающиеся двумя аминокислотными заменами в 136 и 148 положениях полипептидной цепи, вызванными соответствующими точковыми мутациями в позициях 5309 (С→Т) и 5345 (А→С) [10]. Показано, что аллель В гена каппа-казеина положительно коррелирует с более высоким содержанием общего протеина в молоке, повышенным содержанием каппа-казеина, а также лучшими сыродельными характеристиками молока, что в свою очередь может быть использовано в селекционной практике. Анализ данных показал, что более твердые сыры могут быть изготовлены только из молока коров, имеющих генотип ВВ, также из такого молока получается больший выход сыра, чем из молока коров, имеющих генотипы АА или АВ. В связи с вышеперечисленным, аллель В гена каппа-казеина предложено использовать в качестве генетического маркера молочной продуктивности в селекционной практике КРС [10, 11].

Материалы и методы

Материалом исследования послужили быкопроизводящие коровы голштинской (n = 109) и белорусской черно-пестрой породы с условной долей наследуемости по голштинской породе до 69,1% (n = 289). Средняя продуктивность по наивысшей лактации составляет 9219 ± 1073 л, что соответствует требованиям Республиканской программы по племенному делу (2011–2015 гг.). В качестве источника информации использованы племенные карты исследуемых животных с данными об их молочной продуктивности на основании систематического анализа состава молока, проводимого в лаборатории предприятия, предоставляющего образцы (Несвижский филиал РУСП «Минское племенное предприятие»).

Геномную ДНК выделяли из крови коров, используя набор Diatom™ Prep²⁰⁰ (Лаборатория Изоген, Москва), согласно инструкции фирмы-изготовителя. Определение генотипа осуществлялось методом ПЦР-ПДРФ.

Для генотипирования исследуемых животных по локусу каппа-казеина были использованы праймеры VAR5 и VAR3 [4]:

VAR5 5-ata gcc aaa tat atc cca att cag t-3

VAR3 5-ttt att aat aag tcc atg aat ctt g-3

Режим ПЦР: «горячий старт» 95 °С – 5 мин; 94 °С – 1 мин – денатурация; 58 °С – 1 мин – отжиг праймеров; 72 °С – 1 мин – синтез (35 циклов); элонгация – 5 мин при 72 °С.

Затем аликвоту амплификата 10 мкл обрабатывали 20 ед. рестриктазы *Hind* III в 1х буфере «W» с добавлением BSA (СибЭнзим, Россия) и инкубировали при 37 °С в течении 8 часов. Фрагменты разделяются в 2%-ном агарозном геле и визуализируются в УФ после окрашивания бромистым этидием (рис. 1).

Аллель А не имеет сайта рестрикции, поэтому амплификат после рестрикции остается неизменным (рис. 1). Аллель В имеет сайт рестрикции для рестриктазы *Hind* III, поэтому в результате рестрикции образуются два фрагмента: 377 и 155 п.н. Присутствие в образце трех фрагментов свидетельствует о гетерозиготном генотипе АВ.

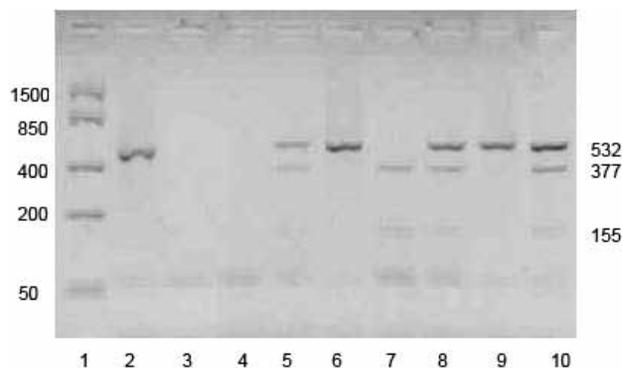


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bCSN-Hind* III

Дорожка 1 – маркер молекулярных масс FastRuler™ Low Range DNA Ladder, dye-to-use, № SM1103 (Fermentas, Литва); дорожка 2 – положительный контрольный образец ПЦР-продукт 532 п.н. фрагмента гена *bCSN-Hind* III; дорожка 3 – отрицательный контрольный образец ПЦР; дорожка 4 – отрицательный контрольный образец рестрикции; дорожки 5, 8, 10 – фрагменты рестрикции 532, 377 и 155 п.н., соответствующие генотипу *bCSN-Hind* III^{AB}; дорожки 6, 9 – фрагмент рестрикции 532 п.н., соответствующий генотипу *bCSN-Hind* III^{AA}; дорожка 7 – фрагменты рестрикции 377, 155 п.н., соответствующие генотипу *bCSN-Hind* III^{BB}.

Электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле (SeaKem LE Agarose, Lonza, США)

Результаты и обсуждение

Оценка гена каппа-казеина в качестве генетического маркера молочной продуктивности у коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород, проводилась в два этапа.

Первый этап отражает традиционный подход, который предполагает определение предпочтительного и нежелательного генотипа путем сравнения между собой показателей продуктивности у соответствующих групп животных. Традиционно предпочтительным считается генотип, обладатели которого характеризуются наибольшей продуктивностью по исследуемому признаку. Генотипы, обладатели которых характеризуются более низкой продуктивностью по исследуемому признаку, принимаются как нежелательные.

Второй этап, предложенный нами дополнительно к традиционному подходу, включал последующее сравнение показателей продуктивности у групп животных с предпочтительными и нежелательными генотипами относительно общей выборки и оценку значимости наблюдаемых отличий.

Средние значения удоя коров голштинской и черно-пестрой породы отражены на рис. 2.

У голштинских коров по признаку удоя лидирует группа с генотипом $bCSN3^{BB}$. Данный генотип является предпочтительным по от-

ношению к генотипу $bCSN3^{AA}$. У коров черно-пестрой породы мы отмечаем противоположную тенденцию: несколько повышенный удой наблюдается в группе с генотипом $bCSN3^{AA}$ и, следовательно, данный генотип является предпочтительным (рис. 2).

Статистическая оценка разницы между группами с разными генотипами, а также сравнение продуктивности животных с определенным генотипом по отношению к общей выборке проводилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Если величина t -статистики больше, чем t критическое двухстороннее (и $p(T \leq t)$ двухстороннее меньше заданного уровня значимости α), то можно считать, что сравниваемые группы значимо отличаются по среднему значению признака. Результаты статистического анализа разницы показателей удоя у анализируемых групп приведены в табл. 1. Из которой следует, что на предприятии СПК АК «Снов» голштинские коровы с генотипом $bCSN3^{BB}$ значимо отличаются и от животных с генотипом $bCSN3^{AA}$, и $bCSN3^{AB}$. Это значит, что удой в группе с генотипом $bCSN3^{BB}$ статистически значимо превышает среднее значение выборки. Таким образом, у голштинских коров на предприятии СПК АК «Снов» генотип $bCSN3^{BB}$ ассоциирован с повышенным удоем и может применяться как генетический маркер.

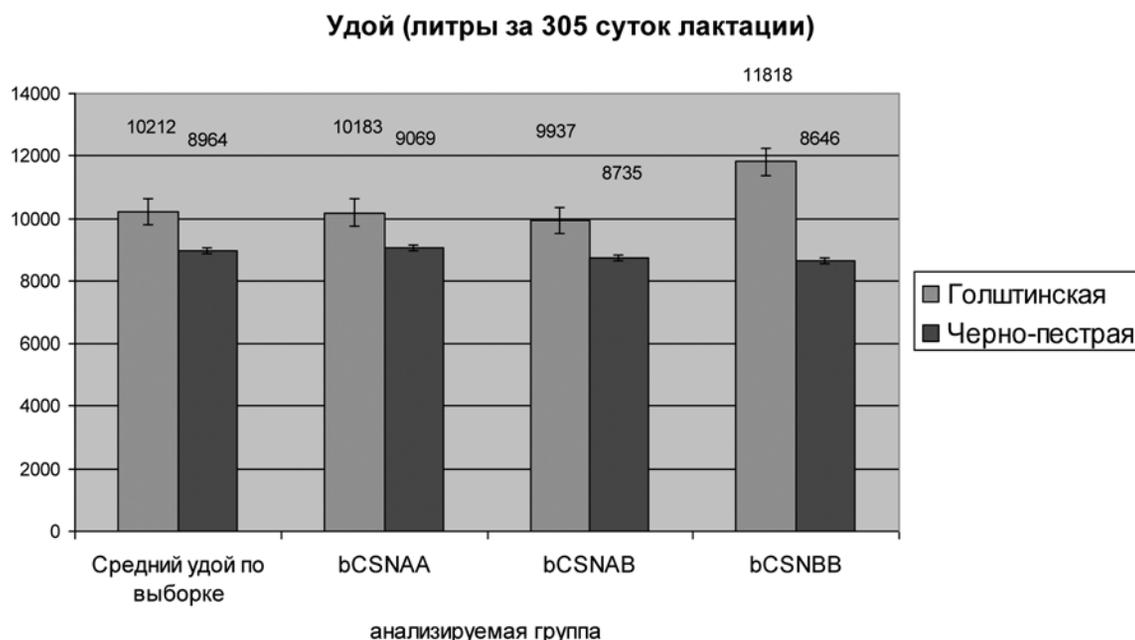


Рис. 2. Удой за 305 суток лактации у голштинских и черно-пестрых коров с разными генотипами по гену каппа-казеина ($m \pm m_0$)

Из данных, приведенных в табл. 1, так же следует, что удой у черно-пестрых коров с генотипом *bCSN3^{AA}* значимо отличается и от животных с генотипом *bCSN3^{AB}*. Это позволяет рассматривать генотип *bCSN3^{AA}* как предпочтительный у черно-пестрых коров по признаку удоя. Однако по отношению к среднему показателю выборки выявляемое

различие значимым не является. Следовательно, проведение отбора животных по данному генотипу в селекционных целях будет нецелесообразным.

Средние значения продуктивности молочного белка у коров голштинской, а также черно-пестрой породы отражены на рис. 3.

Таблица 1

Статистическая оценка различия средних показателей удоя в группах с разными генотипами между собой и по отношению к общей выборке среди коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород

Статистические показатели	Группы сравнения					
	AA-AB	AA-BB*	AB-BB*	AA-выборка	AB-выборка	BB-выборка*
Голштинская порода						
<i>t</i> -статистика	1,15	-2,74	-2,60	-0,14	1,05	-2,55
<i>p</i> (<i>T</i> ≤ <i>t</i>) двухстороннее	0,25	0,01	0,01	0,89	0,30	0,01
<i>t</i> критическое двухстороннее	1,98	1,99	2,04	1,97	1,98	1,98
Белорусская черно-пестрая порода						
<i>t</i> -статистика	2,13	0,67	0,16	-0,81	1,35	0,52
<i>p</i> (<i>T</i> ≤ <i>t</i>) двухстороннее	0,03	0,51	0,88	0,42	0,18	0,61
<i>t</i> критическое двухстороннее	1,98	1,98	2,01	1,97	1,97	1,97

* – различие средних показателей в этих группах статистически значимо.

Отличие между группами статистически значимо, если *t*-статистика ≥ *t* критическое двухстороннее (и *p*(*T* ≤ *t*) ≤ α; α = 0,05)



Рис. 3. Продуктивность молочного белка за 305 суток лактации у голштинских и черно-пестрых коров с разными генотипами по гену каппа-казеина (*m* ± *m_Q*)

Из рис. 3 видно, что у голштинских коров по признаку белковомолочности лидирует группа с генотипом $bCSN3^{BB}$. Данный генотип является предпочтительным по отношению к генотипу $bCSN3^{AA}$. У коров черно-пестрой породы группа с генотипом $bCSN3^{BB}$ характеризуется несколько боль-

шим уровнем белковомолочности, однако эта разница находится в пределах статистической ошибки.

Результаты статистической оценки разницы между группами с разными генотипами и по отношению к общей выборке приведены в табл. 2.

Таблица 2

Статистическая оценка различия средних показателей белковомолочности в группах с разными генотипами между собой и по отношению к общей выборке среди коров голштинской и белорусской черно-пестрой породы

Статистические показатели	Группы сравнения					
	AA-AB	AA-BB*	AB-BB*	AA-выборка	AB-выборка	BB-выборка*
Голштинская порода						
t -статистика	0,48	-2,52	-2,31	-0,29	0,30	-2,61
$p(T \leq t)$ двухстороннее	0,63	0,01	0,03	0,77	0,77	0,01
t критическое двухстороннее	1,98	1,99	2,04	1,97	1,98	1,98
Белорусская черно-пестрая порода						
t -статистика	0,62	0,23	0,04	0,28	-0,44	-0,17
$p(T \leq t)$ двухстороннее	0,54	0,82	0,96	0,78	0,66	0,86
t критическое двухстороннее	1,97	1,98	2,01	1,97	1,97	1,97

* – различие средних показателей в этих группах статистически значимо

Отличие между группами статистически значимо, если t -статистика $\geq t$ критическое двухстороннее (и $p(T \leq t) \leq a$; $a = 0,05$)

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что на предприятии СПК АК «Снов» голштинские коровы с предпочтительным генотипом $bCSN3^{BB}$ значимо отличаются от общей выборки. Что делает целесообразным отбор коров с таким генотипом при осуществлении селекционных мероприятий для увеличения продуктивности молочного белка в популяции.

Заключение

По результатам межпородного сравнительного анализа продуктивности голштинских и черно-пестрых коров нами было установлено следующее:

1. Фенотипический эффект полиморфного гена каппа-казеина у коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород является противоположным. Генотип $bCSN3^{BB}$ является предпочтительным у коров голштинской породы по признаку удоя, в то время как у коров черно-пестрой породы предпочтителен генотип $bCSN3^{AA}$.

2. У голштинских коров генотип $bCSN3^{BB}$ ассоциирован с повышенным удоем статистически значимо, что позволяет рекомендовать его в качестве генетического маркера для селекционных программ.

3 В отношении признака продуктивности общего молочного белка у коров голштинской и черно-пестрой пород прослеживается та же тенденция к противоположному фенотипическому эффекту генотипов. В частности генотип $bCSN3^{BB}$ является предпочтительным у голштинских коров и альтернативным у черно-пестрых. Ассоциация генотипа $bCSN3^{BB}$ с повышенной белковомолочностью является значимой, что позволяет рекомендовать его для селекционных программ в качестве генетического маркера повышенной белковомолочности у голштинских коров.

Список использованных источников

1. Implementation of marker-assisted selection: practical lessons from dairy cattle / D. Boichard [et al.] // 8th World Congress on Genetics

- Applied to Livestock Production, August 13–18, 2006. – Belo Horizonte M. G. Brasil, 2006. – Vol. 34. – P. 186.
2. Testing marker assisted selection in a real breeding program / A.J. Chamberlain [et al.] // 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13–18, 2006. – Belo Horizonte M. G. Brasil. – 2006. – Vol. 34. – P. 184.
3. Can the same genetic markers be used in multiple breeds? / M.E. Goddard [et al.] // 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13–18, 2006. – Belo Horizonte M. G. Brasil. – 2006. – Vol. 34. – P. 191.
4. Increasing milk production in cattle using DNA marker assisted selection (Pit-1) / A. Vlastic [et al.] // Buletinul USAMV-CN. – 2003. – Vol. 59. – P. 188–191.
5. *Pit1* gene Hinf I RFLP and growth traits in double-musled Belgian Blue cattle / R. Renaville [et al.] // J. Anim. Sci. – 1997a. – Vol. 75. – № 1. – P. 146–148.
6. Белая, Е.В. Оценка индивидуального фенотипического эффекта полиморфных вариантов генов гипофизарного фактора роста-1 (*bPit-1*) и инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*) на признаки молочной продуктивности у черно-пестрого голштинизированного крупного рогатого скота / Е.В. Белая, М.Е. Михайлова, Н.В. Батин // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – 2012. – Т. 13. – С. 30–35.
7. Михайлова, М.Е. Влияние HinfI-полиморфизма гена гипофизарного фактора роста *bPit-1* на признаки молочной продуктивности крупного рогатого скота голштинской и черно-пестрой пород / М.Е. Михайлова, Е.В. Белая // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2010. – Т. 11. – С. 120–126.
8. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада *bGHR* и *bIGF-1* на признаки молочной продуктивности у коров голштинской породы / Е.В. Белая [и др.] // Материалы Международной научно-практической конференции «Генетика и биотехнология на рубеже тысячелетий» (к 45-летию основания Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси). – Минск 25–29 октября 2010 г. / редколл А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2010. – С. 94.
9. Генотипирование полиморфных вариантов гена гормона роста, ассоциированного с молочной продуктивностью и ДНК-диагностика мутации VLAD в белорусской популяции КРС / Е.В. Белая [и др.] // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Укр.т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; ред. кол. І.Р. Бариляк [та інш.]. – К.: Логос, 2008. – Т. 4. – С. 133–138.
10. Сулимова, Г.Е. Анализ полиморфизма ДНК кластерных генов у крупного рогатого скота: гены казеинов и гены главного комплекса гистосовместимости (*BoLA*) / Г.Е. Сулимова [и др.] // Цитология и генетика. – 1992. – Т. 26. – С. 18–26.
11. Михайлова, М.Е. ДНК-технологии в животноводстве / М.Е. Михайлова // Наука и инновации. – 2007. – № 1(47). – С. 32–36.

Дата поступления статьи 13 августа 2015 г.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ТЕТЕРЕВА БЕЛОРУССКОГО И УКРАИНСКОГО ПОЛЕСЬЯ

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

Введение

На территории Республики Беларусь тетерев – немногочисленный гнездящийся оседлый вид. Незначительное сокращение численности тетерева было отмечено в восточных районах Беларуси еще в начале XX века. Во второй половине XX века результаты учетов, проводившихся М.С. Долбиком [1–4], показали, что к концу 1970-х годов плотность тетерева снизилась почти вдвое в сравнении с концом 1950-х, уменьшилось число токов, так же, как и количество самцов, вылетающих на один ток.

Причиной такого снижения численности послужили изменения всего комплекса местообитаний данного вида в результате интенсивной мелиорации и сельскохозяйственного освоения естественных угодий с оптимальными для тетеревов структурными показателями (сочетанием открытых пространств с определенным типом древесно-кустарниковой растительности).

Устойчивая тенденция к сокращению численности проявилась в Беларуси также и в 2000-е годы. К 2008 г., в сравнении с 2001 г., численность тетерева сократилась на 21%, а к 2014 – уже на 30% [5–8]. Современная весенняя численность данного вида на территории Республики Беларусь составляет примерно 36 тыс. особей (данные Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь за 2012–2014 гг.).

Самые ранние и в наибольшей степени негативные тенденции проявились в западной части страны: в Брестской области весенняя численность сократилась с 12,5 тыс. особей в 1992 г. до 4,3 тыс. особей в 2012 г., т.е. примерно в 3 раза, а в Гродненской области – с 9,1 тыс. особей в 1990 г. до 1,1 тыс. особей в 2013 г., т.е. в 8 раз. В Гомельской области

в настоящее время численность тетерева составляет 22% от общей его численности в Беларуси. Это единственная область, в которой численность тетерева остается достаточно стабильной и держится примерно на одном и том же уровне, начиная с 2000 г. и по настоящее время, несмотря на общую отрицательную тенденцию по стране. Повидимому, это связано с наличием обширных, пригодных для тетерева угодий в крупных лесоболотных массивах, пойменных биотопах, а также в зоне отселения ЧАЭС.

В связи со значительным сокращением численности тетерева на территории Беларуси актуальным является проведение генетических исследований, что позволит судить о генетическом разнообразии популяции и необходимости выработки дополнительных мер по сохранению данного вида в нашей стране. Анализ генетического разнообразия и дифференциации популяций тетерева активно ведется в странах западной и центральной Европы [9–16]. В качестве основных маркеров для исследования генетической структуры популяций тетерева выступают микросателлиты, с помощью которых можно выявлять нейтральное генетическое разнообразие, миграционные процессы и возможное негативное влияние инбридинга в локальных популяциях животных [17–19].

Что касается восточно-европейских популяций тетерева, то до сих пор они остаются недостаточно изученными. Исследование тетерева в данном регионе, в том числе с использованием микросателлитных маркеров, проводилось М.А. Павловской [20] и было посвящено анализу генетического разнообразия и дифференциации популяций тетерева Украинского Полесья.

Данные из работы М.А. Павловской [20] использованы в настоящем исследовании, что позволило провести сравнение генетического разнообразия популяций тетерева Белорусского и Украинского Полесья и оценить уровень их генетической дифференциации. Полученные данные могут быть использованы для оценки хозяйственной значимости исследуемых популяций тетерева в дальнейших работах по повышению их устойчивости.

Материалы и методы

Для исследования генетического разнообразия и популяционной структуры тетерева на территории Белорусского Полесья

в период с апреля по ноябрь 2014 года были собраны образцы мышечной ткани от 21 особи (табл. 1), которые принадлежали трем пространственно разобобщенным популяциям: 13 особей из Полесского радиационно-экологического заповедника (Гомельская область), 6 особей из Ганцевичского района (Брестская область) и 2 особи, добытые в районе поселка Милашевичи (Лельчицкий район, Гомельская область). В целях оценки генетической дифференциации белорусской популяции тетерева от украинской популяции вида, а также сравнения их генетического разнообразия были привлечены 27 образцов с Украинского Полесья.

Таблица 1

Описание проб тетерева Белорусского Полесья

№	Код пробы	Дата	Место
1	Tet_1	08.04.2014	Гомельская обл., ПГРЭЗ, Погонное
2	Tet_2	08.04.2014	
3	Tet_3	08.04.2014	
4	68-14	10.11.2014	Гомельская обл., ПГРЭЗ, Кухновщина
5	67-14	10.11.2014	
6	71-14	13.11.2014	Гомельская обл., Бабчинское лесничество, бнп Оревичи, ПГРЭЗ
7	55-14	22.10.2014	
8	56-14	22.10.2014	
9	70-14	13.11.2014	Гомельская обл., ПГРЭЗ, Воротецкое лесничество КПП «Майдан»
10	78-14	18.11.2014	
11	77-14	17.11.2014	
12	79-14	18.11.2014	
13	60-14	23.10.2014	Гомельская обл., ПГРЭЗ, Новопокровское лесничество
14	Tet_10	22.04.2014	Гомельская обл., Лельчицкий р-н, Милашевичи
15	Tet_11	20.04.2014	
16	Tet_4	10.04.2014	Брестская обл., Ганцевичский р-н
17	Tet_5	10.04.2014	
18	Tet_6	10.04.2014	
19	Tet_7	15.04.2014	
20	Tet_8	15.04.2014	
21	Tet_9	15.04.2014	

Выделение ДНК проводилось при помощи наборов Genomic DNA Purification Kit (Fementas), а также DNEasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN). Использовался стандартный для этих наборов протокол выделения. Для визуа-

лизации качества выделенной ДНК проводился горизонтальный электрофорез в агарозном геле.

Для амплификации образцов ДНК тетерева использовались 9 пар микросателлитных праймеров (табл. 2). ПЦР-смесь готовилась

Таблица 2
Описание использованных в работе микросателлитных праймеров

Локус	Прямой праймер, 5'-3'	Обратный праймер, 5'-3'	Температура отжига, °С	Флуоресцентная метка	Размер аллелей, п. н.
ADL 230	GCC AAA TAG TAA TCC ACT GC	TCG CTC TTG CCA TTG TAA GT	48	FAM	89–115
ADL 184	GCC TCC TCA CCC ACA AAA CC	TCA GTA ACA CCA CGA ATG CC	54	HEX	109–120
ADL 142	CAG CCA ATA GGG ATA AAA GC	CTG TAG ATG CCA AGG AGT GC	54	TAMRA	193–224
BG 15	AAATA GTTTGCTAGGGCTTAC	TACA TTTTCA TTGTGGACTTC	54	FAM	160–197
BG 18	CCATACTTA ACTTGCACTTTC	CTGATACA AAGA TGCCTACAA	54	TAMRA	155–181
TUT 1	GGTCTACATTTGGCTCTGACC	ATATGGCA TCCSAGCTATGG	60	TAMRA	199–227
TUT 2	CCGTGTCAA GTTCTCCAAC	TTCAAAGCTGTGTTTCATTAGTTG	60	HEX	134–139
TUT 3	CAGGAGGCCTCAACTAATCACC	CGATGCTGGACACAGAAGTGAC	60	FAM	157–174
TUT 4	GAGCATCTCCSAGAGTCAAGC	TGTGAACCCAGCAACTGAGC	60	FAM	157–173

в объеме 25 мкл и содержала 2,5 мкл 10x буфера, содержащего $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 мкл 10x смеси dNTPs, 1,5 mM Mg-Cl_2 , по 5 pmol прямого и обратного праймеров, рекомендованных в работах [9, 20], 0,01 ед. Taq-полимеразы и 2 мкл ДНК исследуемых образцов. В работе использовался амплификатор модели Px2 Thermal Cycler (Thermo, США). Все компоненты ПЦР-смесей были произведены ОДО «Праймтех».

Программа проведения ПЦР представлена в табл. 3.

Фрагментный анализ полученных образцов производился на базе Института биоорганической химии НАН Беларуси. Определение размеров аллелей в исследуемых образцах производилось в программе GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems, США). Оценка частоты нулевых аллелей для каждого локуса и тестирование на наличие неравновесного сцепления генов и на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга проводили с помощью программы Genepop 1.2 [21].

Тест на подверженность популяций в прошлом резкому снижению численности (эффект бутылочного горлышка) был проведен в программе Bottleneck 1.2.02 [22]. В данной работе использовалась модель TPM (two phase model) со следующими параметрами: $P_s = 0,88$, variance – 10%.

Расчет таких показателей генетического разнообразия, как число аллелей в локусе (N alleles), аллельное богатство (AR) и коэффициент инбридинга Райта (Fis) (Wright, 1943) производился в программе FSTAT 2.9.3.2 [23], а расчет наблюдаемой (H_o) и ожидаемой (H_e) гетерозиготности – в программе Genetix 4.05.2 [24]. Проверка наличия статистически достоверных различий между популяциями тетерева по значениям вышеперечисленных индексов (кроме Fis) проводилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), реализованного в программе PAST [25].

Таблица 3

Температурный и временной режимы проведения ПЦР для микросателлитных локусов

Шаг	Число циклов	Температура, °С	Время
Начальная активация	1	95	15 мин
Денатурация, отжиг и элонгация	40	94	30 с
		Температура отжига праймера, °С	90 с
		72	60 с
Финальная элонгация	1	60	30 мин
Хранение	–	8	∞

Для анализа генетической дифференциации популяций использовались следующие индексы: *Gst*, рассчитанный в программе POPTREE2 [26], *Fst*, рассчитанный в программе ARLEQUIN [27]. Дополнительно был рассчитан индекс *Dest* в программе SMOGD [28], так как считается, что индексы *Gst* и *Fst* могут быть ненадежными, когда генетическое разнообразие изучаемых популяций очень высокое (Jost, 2008, цит. по [20]).

Для отображения и оценки популяционной структуры использовался факториальный анализ соответствия (FCA), реализованный в программе Genetix 4.05.2 [24], и возможности программы STRUCTURE [29, 30]. Последняя программа работала со следующими настройками: модель – admixture model, неопределенная популяционная структура (undefined

populations structure), корреляция частот аллелей между популяциями (correlated allele frequencies among populations), длина периода отжига (length of burning period) = 50 000, число MCMC (Markov chain Monte Carlo) повторов после отжига = 10 000 (Evanno et al., 2005, цит. по [20]). Было протестировано 10 возможных групп ($K = 1-10$), для каждого варианта было проведено по 20 прогонов. Для поиска наиболее подходящего числа кластеров был рассчитан параметр ΔK [31].

Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ генетического разнообразия и генетической структуры популяций тетерева Белорусского и Украинского Полесья производился на основании анализа девяти локусов (табл. 4).

Таблица 4

Частота нулевых аллелей для популяций тетерева Белорусского и Украинского Полесья

Локус	Belarus	Ukraine
ADL184	0,19	0,00
ADL142	0,00	0,00
TUT2	0,00	0,17
TUT3	0,00	0,12
TUT4	0,00	0,00
ADL230	0,00	0,00
BG15	0,00	0,19
BG18	0,00	0,18
TUT1	0,00	0,27

Анализ частоты аллелей в белорусской популяции тетерева показал присутствие неравновесного сцепления только для двух локусов ADL184 и TUT2, в украинской популяции

тетерева неравновесное сцепление наблюдалось для локусов ADL230 и ADL142 [20]. Отсутствие неравновесного сцепления генов по всем остальным локусам как в белорусской,

так и в украинской популяциях тетерева говорит о возможности их использования для дальнейшего анализа генетического разнообразия и популяционной структуры.

Проведенный анализ в программе Bottleneck 1.2.02 на подверженность белорусской популяции тетерева резкой редукции численности в прошлом не выявил наличия эффекта

бутылочного горлышка ($p = 0,55$). Для украинской популяции тетерева также не было установлено сильного снижения численности в прошлом [20].

Результаты анализа числа аллелей в локусе (N alleles) и аллельного богатства (AR) в анализируемых популяциях тетерева представлены в табл. 5.

Таблица 5

**Данные по числу аллелей и аллельному богатству в популяциях тетерева
Белорусского и Украинского Полесья**

Локус	PGREZ		Brest		Gomel		Belarus		Ukraine	
	N alleles	AR	N alleles	AR						
ADL184	10	3,29	7	3,47	3	3,00	10	9,86	3	3,00
ADL142	12	3,56	6	3,25	4	4,00	14	13,76	11	9,88
TUT2	4	2,44	4	2,83	2	2,00	4	4,00	11	9,58
TUT3	10	3,16	5	3,22	2	2,00	11	10,86	13	11,50
TUT4	8	3,09	5	3,13	4	4,00	8	8,00	8	7,28
ADL230	17	3,77	6	3,37	4	4,00	18	18,00	3	2,99
BG15	12	3,34	5	3,09	3	3,00	13	12,62	13	11,76
BG18	12	3,66	7	3,27	4	4,00	15	15,00	7	6,73
TUT1	11	3,53	9	3,73	4	4,00	15	14,76	16	13,80
Среднее	10,70	3,33	6,00	3,26	3,30	3,30	12,00	11,87	9,44	8,50

Примечание. PGREZ – популяция тетерева из ПГРЭЗ (Гомельская область), Gomel – популяция тетерева из района поселка Милашевичи (Лельчицкий район, Гомельская область), Brest – популяция тетерева из Ганцевичского района (Брестская область), Ukraine – популяция тетерева с территории Украинского Полесья, Belarus – объединенная популяция тетерева с территории Белорусского Полесья

Как видно из табл. 5, для белорусских популяций тетерева характерны примерно равные средние значения аллельного богатства (AR), тогда как средние значения числа аллелей на локус распределены неравномерно. Так, наибольшее среднее значение числа аллелей на локус наблюдается в популяции тетерева из ПГРЭЗ. В популяции тетерева из Брестской области данный показатель имеет среднее значение, тогда как для популяции в районе поселка Милашевичи наблюдается наименьшее среднее значение числа аллелей на локус, что может быть связано с крайне низким числом особей в популяции Gomel, взятых для исследования. Сравнительный анализ средних значений числа аллелей на локус и аллельного богатства демонстрирует более высокие значения обоих показателей в популяции тетерева, обитающей на территории Белорусского Полесья. Наиболь-

шие различия между белорусской и украинской популяциями тетерева наблюдаются по локусам ADL184, TUT2, ADL230 и BG18.

Генетическое разнообразие по значениям индексов наблюдаемой (H_o) и ожидаемой гетерозиготности (H_e) в популяциях тетерева, обитающих в Белорусском Полесье, характеризуется примерно одинаково высокими значениями (табл. 6). Сравнение значений наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности в популяциях тетерева Белорусского и Украинского Полесья показывает, что они обе характеризуются высоким генетическим разнообразием, однако, у белорусской популяции рассматриваемые показатели выше. Общее высокое генетическое разнообразие в популяциях тетерева на территории Белорусского и Украинского Полесья подтверждается и отсутствием инбридинга ($F_{is} = -0,148$, $F_{is} = -0,074$ соответственно).

Таблица 6

**Показатели генетического разнообразия в популяциях тетерева на территории
Белорусского и Украинского Полесья**

Популяция	Ho	He	Fis
PGREZ	0,99	0,87	-0,145
Gomel	1,00	0,88	-0,212
Brest	0,98	0,87	-0,152
Belarus	0,99	0,87	-0,148
Ukraine	0,77	0,72	-0,074

При сравнении показателей генетического разнообразия между популяциями тетерева Белорусского и Украинского Полесья достоверные различия наблюдались только по показателям наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (рис. 1, результаты для Ho не отображены).

Анализ генетического разделения между

популяциями тетерева Белорусского и Украинского Полесья на основании полиморфизма микросателлитных локусов с использованием индексов Gst и Dest показал отсутствие дифференциации среди белорусских популяций и наличие различий между белорусской и украинской популяциями (табл. 7).

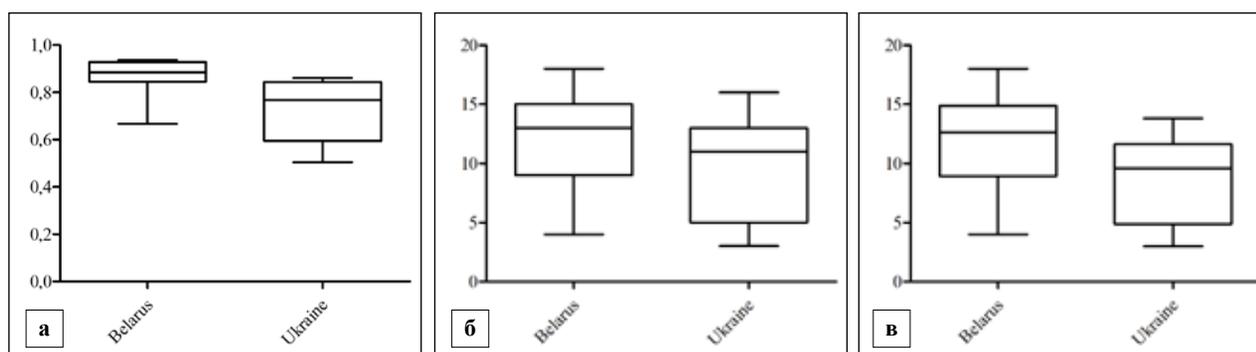


Рис. 1. Сравнение показателей генетического разнообразия между популяциями тетерева Белорусского и Украинского Полесья: а – ожидаемая гетерозиготность ($p = 0,01$); б – среднее число аллелей на локус ($p = 0,23$); в – аллельное богатство ($p = 0,09$)

Таблица 7

**Данные по генетической дифференциации популяций тетерева Белорусского
и Украинского Полесья на основании полиморфизма микросателлитных локусов**

Локус	PGREZ, Gomel, Brest		Belarus, Ukraine	
	Gst	Dest	Gst	Dest
ADL184	-0,186	-0,47	0,119	0,91
ADL142	-0,181	-0,63	0,018	0,58
TUT2	-0,213	-0,22	0,245	1,00
TUT3	-0,023	0,58	0,048	1,00
TUT4	-0,158	-0,06	0,018	0,28
ADL230	-0,172	-0,64	0,103	0,84
BG15	-0,176	-0,31	0,089	1,00
BG18	-0,139	0,02	0,031	0,71
TUT1	-0,171	-0,86	0,042	0,99
Среднее	-0,157	-0,274	0,079	0,811

При этом наибольшие различия наблюдаются по локусам ADL184, TUT2, TUT3, ADL230, BG15 и TUT1. Полученные данные подтверждаются значениями общего индекса фиксации F_{st} . Так, среди белорусских популяций тетерева наблюдается крайне низкое значение генетического разделения только между популяциями с территории ПГРЭЗ и Брестской области – $F_{st} = 0,01$ ($p = 0,03$), а между попу-

ляциями тетерева Белорусского и Украинского Полесья значение данного показателя равнялось $0,19$ ($p < 0,001$).

Наличие слабой генетической структуры внутри белорусской популяции тетерева и подтверждение выявленного разделения белорусской и украинской популяций было показано с помощью метода FCA (рис. 2, рис. 3 соответственно) и программы STRUCTURE ($\Delta K = 42,71$, рис. 4).

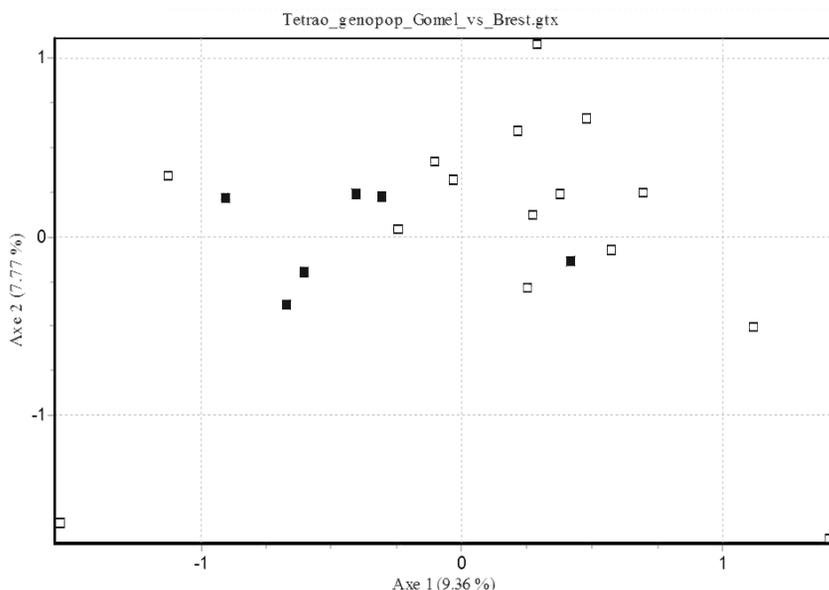


Рис. 2. Генетическая структура белорусских популяций тетерева, полученная с помощью метода FCA (белые квадраты – объединенные популяции тетерева Гомельской области (PGREZ, Gomel), черные квадраты – популяция тетерева Брестской области (Brest))

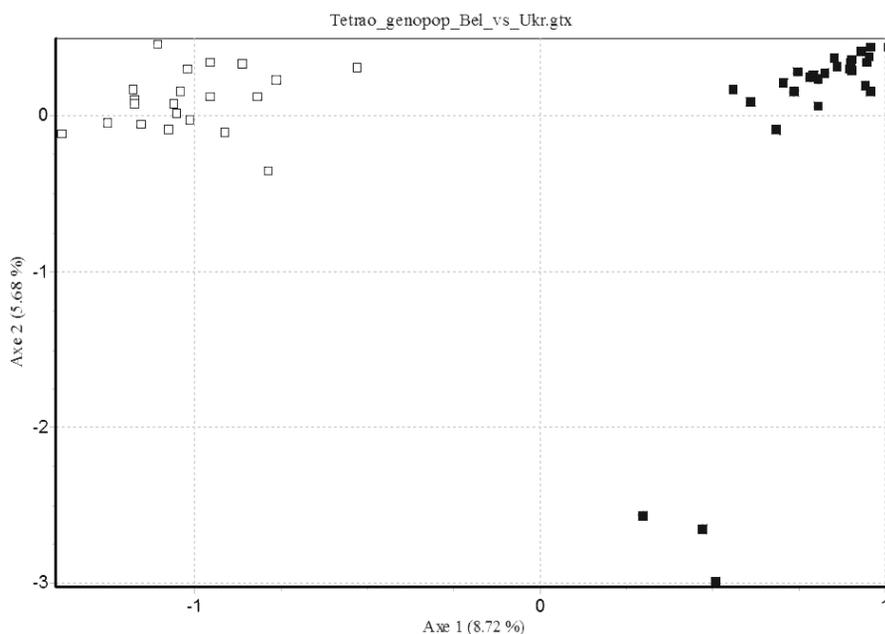


Рис. 3. Генетическая структура популяций тетерева Белорусского и Украинского Полесья, полученная с помощью метода FCA (белые квадраты – белорусская популяция тетерева, черные квадраты – украинская популяция)

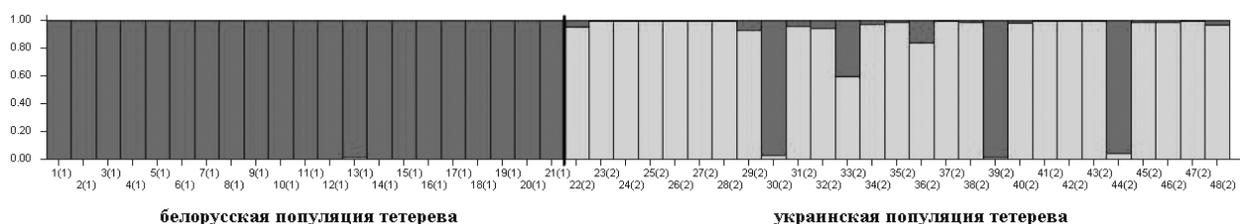


Рис. 4. Байесовский анализ генетической дифференциации популяций тетерева с территорий Белорусского и Украинского Полесья

При этом на основании проведенного байесовского анализа в программе STRUCTURE белорусскую популяцию можно охарактеризовать как генетически однородную, тогда как в украинской популяции тетерева отмечено присутствие смешанных генотипов (14%), имеющих в своем составе аллельные варианты с территории Белорусского Полесья.

Заключение

Таким образом, на основании анализа полиморфизма микросателлитных локусов можно констатировать, что генетическое разнообразие популяций тетерева на территории Полесья характеризуется достаточно высоким уровнем: значения аллельного богатства (AR) составили 8,50 и 11,87, средней наблюдаемой гетерозиготности (H_o) – 0,77 и 0,99, средней ожидаемой гетерозиготности (H_e) – 0,72 и 0,87 для украинской и белорусской популяций соответственно. При этом белорусские популяции тетерева характеризуются одинаковым уровнем генетического разнообразия. Белорусскую популяцию можно охарактеризовать как генетически однородную, так как среди местных популяций тетерева не наблюдается генетического разделения ($G_{st} = -0,157$, $D_{est} = -0,274$).

Между белорусской и украинской популяциями тетерева имеется генетическая дифференциация ($G_{st} = 0,079$, $D_{est} = 0,81$). При этом наибольшие различия наблюдаются по локусам ADL184, TUT2, TUT3, ADL230, BG15 и TUT1. В украинской популяции тетерева наблюдается присутствие смешанных генотипов (14%), включающих аллели, характерные для особей, обитающих на территории Белорусского Полесья.

На основании полученных данных по генетическому разнообразию популяций тетерева Белорусского и Украинского Полесья можно предварительно говорить о наличии у них до-

статочного внутреннего ресурса для поддержания устойчивой численности на современном этапе. Однако последнее не отменяет необходимости проведения природоохранных мероприятий по сохранению важных для вида биотопов.

Авторы статьи выражают искреннюю благодарность сотруднику Полесского радиационно-экологического заповедника В.В. Юрко, сотруднику РУП «Белгосохота» С.С. Протасевичу и охотоведу ГЛХУ «Милошевичский лесхоз» А.П. Гавриленко за сбор полевого материала для исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Б13К 122).

Список использованных источников

1. Долбик, М.С. Ландшафтная структура орнитофауны Белоруссии. / М.С. Долбик. – Минск: Наука и техника, 1974. – 312 с.
2. Долбик, М.С. Белоруссия / М.С. Долбик // Тетеревиные птицы. Размещение запасов, экология, использование и охрана. – М.: Наука, 1975. – С. 216–224.
3. Долбик, М.С. Современное состояние запасов глухаря и тетерева в Белоруссии / М.С. Долбик // Пути повышения эффективности ведения охотничьего хозяйства БССР. – Минск, 1984. – С. 15–16.
4. Федюшин, А.В. Птицы Белоруссии / А.В. Федюшин, М.С. Долбик. – Минск, 1967. – 519 с.
5. Павлющук, Т.Е. Тетерев в Беларуси: современное состояние популяции / Т.Е. Павлющук // Экологическая культура и охрана окружающей среды: I Дорофеевские чтения: материалы международной научно-практической конференции, Витебск, 21–22 ноября 2013 г. / Вит. гос. ун-т; редкол.: И.М. Прищепа (отв. ред. [и др.]). – Витебск: ВГУ им. П.М. Машерова, 2013. – С. 199–201.

6. Павлющик, Т.Е. Современное состояние популяции тетерева в Беларуси / Т.Е. Павлющик, И.А. Малахов // Состояние природной среды Беларуси. Экологический бюллетень. 2009 год. – Минск, 2010. – С. 279–283.
7. Pavlushchick, T. Black Grouse in Belarus: current status and perspectives / T. Pavlushchick // The 7th International Black Grouse Conference: Abstracts of presentations (Pechoro-Ilychskiy State Nature Biosphere Reserve, Yaksha, Republic of Komi, Russia, 24-29 May 2014). – Syktyvkar, 2014. – P. 16–17.
8. Pavlushchick, T. Status of Black Grouse in Belarus / T. Pavlushchick, I. Malakhov // Black Grouse Endangered Species: Abstr. 5-th European Conference, Bialowieza, 5-9 October 2009. – Bialowieza, 2009. – P. 20.
9. Segelbacher, G. Using Microsatellites to Study the Conservation of Black Grouse / G. Segelbacher, J. Hoglund // Cahiers d'Ethologie. – 2000. – Vol. 20. – P. 411–420.
10. Population genetic structure of male black grouse (*Tetrao tetrix* L.) in fragmented vs. continuous landscapes / A. Caizergues [et al.] // Molecular Ecology. – 2003. – Vol. 12. – P. 2297–2305.
11. Corrales, C. 2012. Maintenance of gene flow by female biased dispersal of Black grouse *Tetrao tetrix* in northern Sweden / C. Corrales, J. Höglund // Journal of Ornithology. – 2012. – Vol. 153. – P. 1127–1139.
12. Hoglund, J. Population fragmentation and genetic variability in European Black grouse – a progress report / J. Hoglund, D. Baines, K.J. Larsson, G. Segelbacher // Sylvia 39 (suppl.). – 2003. – P. 17–23.
13. Genetic structure among black grouse in Britain: implications for designing conservation units / J. Hoglund [et al.] // Animal Conservation. – 2011. – Vol. 14. – P. 400–408.
14. Piertney, S.B. Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix*) / S.B. Piertney, J. Höglund // Molecular Ecology Notes. – 2001. – Vol. 1. – P. 303–304.
15. Corrales, C. Phylogeography and subspecies status of Black Grouse / C. Corrales, M. Pavlovskaya, J. Hoglund // J. Ornithol. – 2014. – Vol. 155. – P. 13–25.
16. Genetic variation among endangered Irish red grouse (*Lagopus lagopus hibernicus*) populations: implications for conservation and management / B.S. McMahon [et al.] // Conservation Genetics. – 2012. – Vol. 13. – P. 639–647.
17. Jehle, R. Microsatellite markers in Amphibian conservation genetics: A review / R. Jehle, J.W. Arntzen // Herpetological Journal. – 2002. – Vol. 12. – P. 1–9.
18. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites / E.J. Oliviera [et al.] // Genetics and Molecular Biology. – 2006. – Vol. 29. – P. 294–307.
19. Jarne, R. Microsatellites from molecules to populations and back / R. Jarne, P.J.L. Lagoda // TREE. – 1996. – Vol. 11. – P. 424–429.
20. Pavlovskaya, M. Ukrainian Black grouse (*Tetrao tetrix*) Genetic diversity and population structure: M. Sc. Thesis / M. Pavlovskaya; Biology Education Centre and Department of Population Biology and Conservation Biology Uppsala University. – Uppsala, 2012. – 35 p.
21. Raymond, M. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism / M. Raymond, F. Rousset // Journal of Heredity. – 1995. – Vol. 86. – P. 248–249.
22. Cornuet, J.M. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data / J.M. Cornuet, G. Luikart // Genetics. – 1997. – Vol. 144. – P. 2001–2014.
23. Goudet, J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics / J. Goudet // The Journal of Heredity. – 1995. – Vol. 86, № 6. – P. 485–486.
24. GENETIX 4.05, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations / K. Belkhir [et al.] // Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR. 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France, 2004.
25. Hammer, Ø. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / Ø. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan // Palaeontologia Electronica. – 2001. – Vol. 4, № 1. – 9 p.
26. Takezaki, N. POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows-interface / N. Takezaki, M. Nei, K. Tamura // Molecular Biology and Evolution. – 2010. – Vol. 27. – P. 747–752.
27. Excoffier, L. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis / L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider // Evolutionary Bioinformatics. – 2005. – Vol. 1. – P. 47–50.

28. Crawford, N.G. 2010. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity / N.G. Crawford / *Molecular Ecology Resources*. – 2010. – Vol. 10. – P. 556–557.
29. Pritchard, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics*. – 2000. – Vol. 55. – P. 945–959.
30. Falush, D. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies / D. Falush, M. Stephens, J.K. Pritchard // *Genetics*. – 2003. – Vol. 164. – P. 1567–1587.
31. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet // *Molecular Ecology*. – 2005. – Vol. 14. – P. 2611–2620.

Дата поступления статьи 4 августа 2015 г.

РАЗРАБОТКА ПЦР-ПДРФ ТАБЛИЦ НА ОСНОВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА *EF1a* ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ ТЛЕЙ – ВРЕДИТЕЛЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр-т Независимости, 4

Введение

Тли – вредители сельскохозяйственных культур и других возделываемых растений – относятся к числу фитофагов, требующих постоянного мониторинга численности и видового состава. В фауне тлей встречаются виды и близкие формы, сходные в морфологическом отношении, но значительно различающиеся вредоносностью [1], устойчивостью [2, 3], способностью к трансмиссии фитопатогенных вирусов [4], а также специализацией к конкретным кормовым растениям. В последние годы, с развитием методов ДНК-таксономии, происходит дробление многих ранее описанных видов на комплексы морфологически идентичных видов или подвидов, в соответствии с особенностями их биологии и экологии [5, 6]. При этом вклад каждой из таких форм в суммарный пресс, оказываемый комплексом видов на их кормовые растения, как правило, невозможно установить. Контроль распространения таких форм, а также проникновения на территорию Республики Беларусь чужеродных и, в особенности, карантинных видов вредителей является одной из приоритетных задач современной сельскохозяйственной энтомологии.

Идентификация карантинных, инвазивных и высоко вредоносных видов тлей в природных сообществах вредителей представляет собой проблему, которая в ряде случаев не может быть решена без применения ДНК-технологий [7]. Как было сказано выше, морфологическая идентификация многих близких видов тлей невозможна (криптические виды) или затруднена (сиблинговые виды). В то же время, генетически гомогенные виды тлей зачастую демонстрируют высокую морфологическую пластичность при питании на разных кормовых растениях, что многократно подтверждалось в полевых исследованиях [8]

и в экспериментах [9–11]. Инвазивные виды на новых территориях могут осваивать нетипичные для них кормовые растения. В некоторых случаях происходят и закрепляются на уровне региональных популяций изменения в биологическом цикле [12]. Это также вносит дополнительную сложность в идентификацию видов у тлей. ДНК-технологии, в этом смысле, предоставляют исследователю удобный методологический инструментарий, позволяющий с высокой точностью установить видовую принадлежность не только имаго, но и личинок, а также яиц тлей.

Для видовой идентификации беспозвоночных и, в том числе, насекомых-фитофагов, чаще всего применяется метод, названный «ДНК-штрихкодирование», то есть определение видов по нуклеотидной последовательности маркерной области митохондриального генома [13]. Единственное неудобство данного метода заключается в обязательном проведении секвенирования ДНК – процедуры относительно трудоемкой и дорогостоящей, которая крайне редко может быть проведена «на местах» и требует отсылки образцов в крупные научные центры, оснащенные соответствующим оборудованием. В связи с этим актуальным представлялось предложить метод идентификации видов тлей, позволяющий разграничить вредоносные и не вредящие сельскохозяйственным и другим возделываемым растениям виды без проведения процедуры секвенирования ДНК. Подобным методом, по нашему мнению, может стать идентификация видов по ключам, разработанным на основе межвидового полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ).

Суть метода ПЦР-ПДРФ-идентификации заключается в создании видовых идентификационных таблиц, включающих сведения о количестве и длинах ДНК-фрагментов,

образующихся в результате обработки продукта ПЦР указанными рестриктазами. При этом возможно создание ключа, представляющего собой уникальную комбинацию конкретных ферментов рестрикции, позволяющих уверенно дифференцировать близкие виды вредителей по количеству и длине образующихся рестрикционных фрагментов [14].

Впервые создание идентификационных ключей на основе ПДРФ для определения видов тлей было предложено австралийскими исследователями в 2007 г. [15]. В их работе для создания ключей была использована последовательность митохондриального гена *COI*. Однако применение этого гена имеет ограничения, связанные с высокой консервативностью последовательности *COI* у тлей. Это позволило нам предположить, что использование в качестве целевого ядерного гена, обладающего известной и стабильной экзон-интронной структурой, позволит выбрать и предложить две группы рестрикционных ферментов с локализацией сайтов узнавания в консервативных (экзоны) и вариабельных (интроны) областях для идентификации менее и более близких видов соответственно. Ген

субъединицы α фактора элонгации 1 (*EF1a*) тлей, как было показано ранее [16], отвечает названным требованиям. Это ядерный ген, обладающий у тлей чрезвычайно консервативной интрон-экзонной структурой. Экзоны гена *EF1a* тлей не варьируют по длине и обладают сравнительно консервативной нуклеотидной последовательностью. В то же время интроны достаточно вариабельны, причем варьируют между видами тлей как по длине, так и по нуклеотидному составу.

Таким образом, целью данной работы было изучить возможность создания ПЦР-ПДРФ-таблиц на основе последовательности гена *EF1a*, а именно, построить рестрикционные карты гена и предложить набор рестрикционных ферментов, позволяющих дифференцировать виды тлей – вредителей сельскохозяйственных культур и виды тех же родов, не вредящие возделываемым растениям.

Материалы и методы

В работе были использованы последовательности гена *EF1a* 26 видов тлей европейской фауны, встречающиеся, в том числе, в Беларуси (табл. 1).

Таблица 1

Виды тлей, включенные в анализ

Вид	Ареал	Повреждаемые растения	Код последовательности в GenBank
<i>Acyrt-hosiphon kondoi</i> Shinji, 1938	Космополит	Люцерна посевная, Астрагал альпийский, Клевер луговой	FJ982417.1
<i>Acyrthosiphon pisum</i> Harris, 1776	Космополит	Горох, бобы, кормовые травы семейства Бобовые (полифаг)	NW 003383839.1
<i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854	Космополит	Тыквы, кабачки, огурцы, картофель, бобы (полифаг)	EU358905.1
<i>Aphis epilobiaria</i> Theobald, 1927	Западная палеарктика, Ближний восток	Растения рода Кипрей	DQ418868.1
<i>Aphis fabae</i> spp. Scopolii, 1763	Космополит	Огурцы, кабачки, картофель, капуста, бобы (полифаг)	JF950583.1
<i>Aphis farinosa</i> Gmelin, 1790	Космополит	Ивы	AY219726.1
<i>Aphis hederæ</i> Kaltentbach, 1843	Космополит	Плющ обыкновенный, Повилика европейская	EU358913.1
<i>Aphis idaei</i> Van der Goot, 1912	Космополит	Малина, костяника, Ежевика сизая	JF950580.1
<i>Aphis nerii</i> , Boyer de Fonscolombe, 1841	Космополит	Растения из семейств Кутровые, Ластовневые	EU358920.1
<i>Aphis pomi</i> de Geer, 1773	Космополит	Яблони, груша, ирга	JF950582.1
<i>Aphis ruborum</i> Börner and Schilder, 1931	Космополит	Земляника, малина, Ежевика сизая, Ежевика кустистая	JF950581.1

Продолжение табл. 1

Вид	Ареал	Повреждаемые растения	Код последовательности в GenBank
<i>Aphis salicariae</i> Koch, 1855	Космополит	Растения рода Кизил и Кипрей	DQ418863.1
<i>Aphis spiraeicola</i> , Patch, 1914	Космополит	Яблони, сливы, груша, капуста, горох, бобы, картофель (полифаг)	EU358925.1
<i>Macrosiphum albifrons</i> Essig, 1911	Космополит	Растения рода Люпин	DQ005154.1
<i>Macrosiphum euphorbiae</i> Thomas, 1878	Космополит	Картофель, горох, кукуруза (полифаг)	NM117788.1
<i>Macrosiphum rosae</i> Mordvilko, 1919	Космополит	Растения семейства Розовые	AY219736.1
<i>Megoura lespezdezae</i> Essig and Kuwana, 1918	Палеарктика, Дальний восток	Аморфа кустарниковая, Леспедеца двуцветная, Копеечник	EU071357.1
<i>Megoura litoralis</i> F.P.Muller, 1952	Западная палеарктика	Чина японская	EU071352.1
<i>Megoura viciae</i> Buckton, 1876	Космополит	Растения родов Чина и Горошек (полифаг)	EU071353.1
<i>Myzus persicae</i> Sulzer, 1776	Космополит	Огурцы, слива, картофель, кукуруза (полифаг)	EF419312.1
<i>Myzus varians</i> Davidson, 1912	Космополит	Сливы, яблони	FJ982429.1
<i>Rhopalosiphum maidis</i> Fitch, 1856	Космополит	Кукуруза, рожь, пшеница, просо, др. злаки	AY219718.1
<i>Rhopalosiphum nymphaeae</i> Linnaeus, 1761	Космополит	Яблони, груши, картофель, кукуруза (полифаг)	EU358935.1
<i>Rhopalosiphum padi</i> Linnaeus, 1758	Космополит	Кукуруза, картофель, пшеница, яблони, груши (полифаг)	AY219719.1
<i>Schizaphis graminum</i> Rondani, (1847), 1852	Космополит	Пшеница, рожь, ячмень, кукуруза	AY219720.1
<i>Schizaphis scirpi</i> Passerini, 1874	Космополит	Растения из рода Рогоз, Камыш, Осока	EU358939.1

Последовательности гена *EF1a* тлей, коллектированных в Беларуси, были получены авторами и опубликованы ранее [16–18]. Кроме этого в работе были задействованы последовательности гена *EF1a*, депонированные другими исследователями в GenBank NCBI [19], за что авторы заочно выражают им искреннюю благодарность.

Анализируемый участок гена соответствовал фрагменту с 259 по 1360 нуклеотид полного гена (215–1103 нуклеотид белок-кодирующей области) и включал частично второй, третий, четвертый и частично пятый экзоны, а также лежащие между ними интроны.

Поиск сайтов рестрикции был проведен в программе BioEdit 7.2.1 [20] для ферментов, производимых компаниями Thermo Scientific и Fermental Internati, как наиболее доступных на белорусском рынке химических реактивов.

Графические рестрикционные карты строили в программе CodonCode Aligner 4.2.7. При построении рестрикционных карт учитывались ферменты, имеющие в последовательности *EF1a* тлей не более двух сайтов рестрикции, как с длинными, так и с короткими сайтами узнавания, поскольку было решено, что образование в результате рестрикции большого числа коротких фрагментов может затруднять интерпретацию получаемых результатов.

В дальнейшем из анализа были исключены рестриктазы, сайты узнавания которых локализовались близко к экзон-интронной границе. Это позволило четко разграничить ферменты с сайтами узнавания в интронах и экзонах гена, с тем, чтобы исключить возможность непредвиденного столкновения со случаями внутривидового полиморфизма. Отдельно были оценены рестриктазы, отрезающие фрагменты

длиной менее 80 пар нуклеотидов, что связано с низкой возможностью для точного определения длины коротких фрагментов в агарозном геле в условиях рутинного эксперимента [5].

Результаты и обсуждение

Поиск сайтов рестрикции в последовательностях *EF1a* 26 видов тлей показал, что большинство проанализированных рестриктаз имели сайты рестрикции в идентичных позициях гена у разных видов тлей, что связано с общей высокой консервативностью белок-кодирующей области гена в этой таксономической группе. Как было показано ранее, межвидовая вариативность последовательности *EF1a* у тлей в основном связана с появлением единичных однонуклеотидных замен в третьих позициях кодонов [16]. Данный уровень полиморфизма в большинстве случаев не обеспечивает вариативности локализации сайтов рестрикции, достаточной для разграничения не только близких видов, но и видов относящихся к разным родам и трибам. Значительная доля рестриктаз, в особенности имеющих короткие или вырожденные сайты узнавания, имела четыре и более сайта рестрикции на указанном участке гена (табл. 2), причем эти сайты могли локализоваться как в интронах, так и в экзонах.

В последовательностях тлей разных родов одни и те же ферменты рестрикции могли вести себя как мелкощепящие или крупно-

щепящие. Например, широко применяемая мелкощепящая рестриктаза HpaII не имела или имела единственный сайт узнавания в последовательностях тлей родов *Acyrtosiphon*, *Aphis*, *Macrosiphum*, *Rhopalosiphum* и, в то же время, обнаруживала 4 сайта узнавания в последовательностях тлей родов *Sitobion* и *Uroleucon*.

В общей сложности 118 эндонуклеаз отвечали заданным требованиям и имели не более 2 сайтов узнавания в изучаемых последовательностях тлей одного рода. После соотнесения локализации сайтов узнавания и рестрикции этих ферментов с интрон-экзонной структурой гена *EF1a* тлей были окончательно отобраны 38 рестриктаз (табл. 3).

Все отобранные ферменты имели сайты узнавания-рестрикции в экзонах либо в экзонах и интроне на некотором удалении от интрон-экзонной границы (не менее 20 нуклеотидов). Рестриктазы с сайтами узнавания внутри интронов имели длинную (6 нуклеотидов) невырожденную (за исключением *BfmI*) последовательность узнавания. Данный факт позволил нам предположить, что случаи внутривидовой вариативности нуклеотидной последовательности гена *EF1a* у тлей, в частности, вариативность последовательности интронов, окажут минимальное влияние на результативность применения предлагаемых ПДРФ-ключей.

Таблица 2

Эндонуклеазы рестрикции, имеющие четыре и более сайта узнавания в последовательностях *EF1a* тлей

Фермент	Сайт узнавания	Количество сайтов узнавания*	Фермент	Сайт узнавания	Количество сайтов узнавания*
AluI	AG'CT	7	HpyCH4V	TG'CA	5
ApoI	r'AATT_y	5	HpyCH4IV	A'CG_T	6
BsaJI	C'CnnG_G	7	HpyF10VI	GCn_nnnnn'nGC	4
BsII	CCnn_nnn'nnGG	4	MaeIII	'GTnAC_	4
BsmAI	GTTCn'nnnn_	5	MseI	T'TA_A	9
BsrI	ACTG_Gn'	6	MwoI	GCnn_nnn'nnGC	4
BstF5I	GGATG_nn'	4	NciI	CC's_GG	5
BstNI	CC'w_GG	6	NlaIII	_CATG'	4
Csp6I	G'TA_C	4	PspGI	'CCwGG_	6
CviJI	rG'Cy	13	RsaI	GT'AC	4
FatI	'CATG_	4	ScrFI	CC'n_GG	7
HphI	GGTGANnnnnnn_n'	6	StyD4I	'CCnGG_	10
HpaII	C'CG_G	4	TaiI	_ACGT'	6

Продолжение табл. 2

Фермент	Сайт узнавания	Количество сайтов узнавания*	Фермент	Сайт узнавания	Количество сайтов узнавания*
Hpy8I	GTn'nAC	5	TaqI	T'CG_A	4
Hpy188III	TC'nn_GA	5	Tsp509I	'AATT_	15
HpyCH4III	AC_n'GT	4	TspRI	_nnCAsTGnn'	4

* – приведено максимально наблюдаемое количество сайтов рестрикции конкретного фермента в последовательностях *EF1a* тлей исследованных видов

Таблица 3

Локализация в последовательностях *EF1a* тлей сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции, использованных для разработки ПЦР-ПДРФ-ключей

Экзоны		Интроны	
Фермент*	Сайт узнавания	Фермент*	Сайт узнавания
<i>BauI</i> (BssSI)	CACGAG	<i>AanI</i> (PsyI)	TTA'TAA
<i>BseDI</i> (BsaJI)	см. табл. 2	<i>BfmI</i> (SfcI)	C'TryAG
<i>BseLI</i> (BsII)	см. табл. 2	<i>DraI</i>	TTT'AAA
<i>BseSI</i> (Bme158I)	GkGCm'C	<i>SspI</i>	AAГ'ATT
<i>Bsh1236I</i> (BstUI)	CG'CG	<i>LguI</i> (SapI)	GCTCTTC
<i>BstXI</i>	CCAnnnnnnTGG	<i>VspI</i> (AseI)	AT'ТААТ
<i>BsuRI</i> (HaeIII)	GG'CC	–	–
<i>Csp6I</i> (CviQI)	См. табл. 2	–	–
<i>DpnI</i>	GA'TC	–	–
<i>Eco130I</i> (StyI)	C'CwwGG	–	–
<i>Eco81I</i> (Bsu36I)	CC'TnAGG	–	–
<i>EcoRI</i>	G'AATTC	–	–
<i>FspBI</i> (BfaI)	C'TAG	–	–
<i>HinII</i> (BsaHI)	Gr'CGyC	–	–
<i>HindIII</i>	A'AGCTT	Экзоны и интроны	
<i>HpaII</i>	C'CGG	Фермент*	Сайт узнавания
<i>HphI</i>	GGTGA	<i>Hin6I</i> (HinP1I)	G'CGC
<i>HpyF3I</i> (DdeI)	C'TnAG	<i>HhaI</i>	GCG'C
<i>KpnI</i>	GGTAC'C	<i>Mph1103I</i> (NsiI)	ATGCA'T
<i>MboI</i>	'GATC	<i>TaqI</i>	См. табл. 2
<i>MspI</i> (HpaI)	C'CGG	–	–
<i>PaeI</i> (SphI)	GCA TG'C	–	–
<i>RsaI</i>	см. табл. 2	–	–
<i>SsiI</i> (AciI)	C'C GC	–	–
<i>TaaI</i> (HpyCH4III)	ACn'GT	–	–
<i>TruII</i>	T'TAA	–	–
<i>XbaI</i>	T'CTAG_A	–	–
<i>XapI</i> (ApoI)	См. табл. 2	–	–

* – в таблице приведены дополнительные варианты названий ферментов, что связано с различной кодировкой названий изоизомеров в используемых в данной работе компьютерных программах для рестрикционного анализа

Сравнительный анализ расположения сайтов рестрикции в последовательности гена *EF1a* у тлей одного рода показал, что в некоторых случаях не удается подобрать композицию из рестриктаз, отвечающих заданным условиям (конкретный производитель, малое число сайтов рестрикции, достаточная длина фрагментов рестрикции, локализация сайтов узнавания вдали от интрон-экзонных границ и т. д.), так, чтобы получить индивидуальный ПДРФ-ключ для всех анализируемых видов. В таких случаях было предложено проводить дифференциацию между видами, поражающими одни и те же кормовые растения. В частности, в роде *Aphis* L. такие группы видов образовали *A. craccivora*, *A. spiraecola* и *A. fabae* spp., поражающие тыквенные, пасленовые и бобы; *A. idaei* и *A. ruborum*, питающиеся на малине и ежевике; а также *A. pomi* и *A. spiraecola*, вредящие яблоням и грушам. Как и ожидалось, оказалось возможным провести взаимную дифференциацию этих видов, проведя сравнительный анализ расположения сайтов рестрикции (рис. 1).

Подобный подход, в соответствии с которым ПДРФ-ключи могут быть построены для видов, питающихся на конкретных кормовых растениях, без учета других видов из тех же таксономических групп, может быть оправдан, поскольку большинство видов тлей имеют достаточно четко очерченный круг кормовых растений. Несмотря на то, что многие виды из числа вредителей сельскохозяйственных и иных возделываемых растений являются полифагами, тем не менее,

разграничение этих видов на группы, ассоциированные с конкретными хозяйственно значимыми (или хозяйственно не значимыми, когда речь идет о вторичных кормовых растениях, представляющих собой резервуар для видов-вредителей) растениями в большинстве случаев возможно. Так, например, виды рода *Rhopalosiphum* Koch – *Rh. nymphaeae*, *Rh. padi* и *Rh. maidis* – могут совместно поражать картофель, кукурузу и пшеницу. Однако с яблонями ассоциированы только *Rh. padi*, способность питаться на яблонях *Rh. nymphaeae* в настоящее время находится под вопросом, а *Rh. maidis* на яблонях не развиваются [21]. Таким образом, в случае с *Rh. nymphaeae*, *Rh. padi* и *Rh. maidis* необходимо иметь ключ, позволяющий уверенно идентифицировать все три вида, для того, чтобы они могли быть дифференцированы на вторичных кормовых растениях. Как показано, совместное применение рестриктаз *EcoRI*, *AanI* и *Hin6I* позволит идентифицировать все три вида на картофеле, пшенице или других злаках (рис. 2).

В будущем данный подход может быть применен для создания каталогов ПДРФ-таблиц для комплексов вредителей конкретных сельскохозяйственных культур.

Для всех видов тлей, включенных в анализ, была составлена общая ПДРФ-таблица, в которой представлены только рестриктазы, позволяющие однозначно идентифицировать каждый из видов (табл. 4). Количество таких рестриктаз варьировало от 4 – для рода *Macrosiphum* до 16 – для рода *Aphis*.

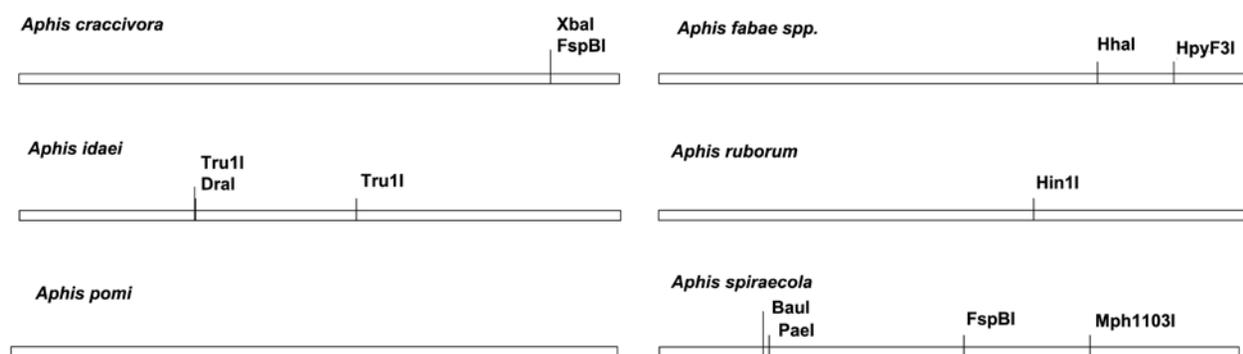


Рис. 1. Сравнительные рестрикционные карты последовательности гена *EF1a* тлей рода *Aphis* L., повреждающих одни и те же кормовые растения: тыквенные, пасленовые, бобы – *A. craccivora*, *A. spiraecola*, *A. fabae* spp.; малину, ежевику – *A. idaei*, *A. ruborum*; яблони, груши – *A. pomi*, *A. spiraecola*.

Таблица 4

ПЦР-ПДРФ-таблица на основе последовательности гена *EF1a* для идентификации видов тлей

Вид	Рестриктазы																						
	BseSI	Csp6I	HindIII	RsaI	SspI	TaaI	VspI	XapI	Bsh1236I	BstXI	Csp6I	DraI	Eco81I	HhaI	HphI	HpyF3I	FspBI	TruI	LguI	Mph1103I	PaeI	XbaI	
<i>Acyrtosiphon kondoi</i>	438, 655	42, 116, 935	262, 279, 552	42, 117, 934	n	386, 707	n	166, 927															
<i>A. pisum</i>	n	n	n	n	467, 635	179, 386, 537	335, 767	n															n
<i>Aphis craccivora</i>	n	n	n	42, 116, 951	20, 304, 785	n	n	108, 363, 638															
<i>A. gossypii</i>	n	n	401, 703	n	20, 304, 780	n	n	412, 692															
<i>A. fabae</i>	n	n	n	42, 116, 938	19, 304, 773	n	283, 813	n															
<i>A. farinosa</i>	n	n	n	42, 116, 950	23, 304, 781	164, 944	n	n															
<i>A. idaei</i>	n	n	n	n	325, 783	n	n	n															
<i>A. nerii</i>	n	325, 785	n	42, 116, 952	461, 649	n	113, 997	n															
<i>A. pomi</i>	n	n	n	n	23, 304, 791	n	n	n															
<i>A. salicariae</i>	n	n	n	n	304, 338, 469	n	n	n															
<i>A. spiraeicola</i>	200, 909	n	138, 171, 800	42, 116, 951	23, 304, 782	n	n	n															
<i>A. ruborum</i>	n	n	n	n	n	n	n	420, 694															
<i>Aphis craccivora</i>	n	n	n	n	n	n	n	n															
<i>A. gossypii</i>	n	n	328, 776	n	n	n	n	n															
<i>A. fabae</i>	n	142, 954	n	n	n	n	n	n															
<i>A. farinosa</i>	n	122, 164, 822	n	n	611, 497	n	n	n															
<i>A. idaei</i>	n	n	n	298, 324, 486	n	n	n	n															
<i>A. nerii</i>	n	n	n	n	n	n	n	n															
<i>A. pomi</i>	n	n	n	n	n	n	n	n															
<i>A. salicariae</i>	332, 779	n	n	n	n	n	n	n															
<i>A. spiraeicola</i>	n	362, 747	526, 583	n	n	283, 826	211, 898	n															
<i>A. ruborum</i>	n	n	n	n	n	n	n	n															
<i>Macrosiphum albifrons</i>	AanI	BfmI	BseDI	VspI	—	—	—	—															
<i>M. euphorbiae</i>	n	n	n	309, 335, 466	—	—	—	—															
	658, 448	n	n	n	—	—	—	—															

Продолжение табл. 4

Вид	Рестриктазы										
	AanI	BfmI	BseDI	VspI	Hin6I	HindIII	KpnI	MphI103I	BsuRI	EcoRI	HhaI
<i>M. rosae</i>	n	135, 982	n	341, 776	—	—	—	—	—	—	—
<i>Megoura litoralis</i>	93, 127, 870	227, 863	n	158, 932	160, 930	540, 550	n	283, 807	93, 127, 870	—	—
<i>M. lespedezae</i>	127, 374, 579	163, 917	166, 914	149, 255, 784	139, 157, 784	259, 274, 547	438, 642	n	127, 374, 579	—	—
<i>M. viciae</i>	93, 127, 870	227, 863	n	158, 932	160, 930	540, 550	n	283, 807	93, 127, 870	—	—
<i>M. litoralis</i>	455, 635	327, 763	—	—	—	—	—	—	455, 635	—	—
<i>M. lespedezae</i>	n	n	—	—	—	—	—	—	n	—	—
<i>M. viciae</i>	455, 635	327, 763	—	—	—	—	—	—	455, 635	—	—
<i>Myzus varians</i>	220, 286, 596	42, 116, 944	109, 993	n	n	n	185, 917	107, 995	220, 286, 596	—	—
<i>M. persicae</i>	n	n	109, 138, 851	153, 945	155, 943	552, 272, 274	n	107, 138, 853	n	—	—
<i>M. varians</i>	441, 661	42, 117, 943	386, 716	170, 193, 739	—	—	—	—	441, 661	—	—
<i>M. persicae</i>	n	n	78, 301, 719	n	—	—	—	—	n	—	—
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	AanI	BshI236I	EcoRI	Hin6I	HpaII	MspI	SsiI	XapI	AanI	—	—
<i>Rh. nymphalaeae</i>	n	n	166, 939	n	253, 852	253, 852	n	n	n	—	—
<i>Rh. padi</i>	331, 775	203, 903	n	156, 947	90, 252, 761	90, 252, 761	n	166, 937	331, 775	—	—
<i>Schizaphis scirpi</i>	BclI	DpnI	DraI	HpyF3I	MboI	XapI	—	—	BclI	—	—
<i>S. graminum</i>	n	n	111, 991	n	n	166, 936	—	—	n	—	—
	107, 999	109, 138, 859	455, 651	176, 930	107, 138, 861	n	—	—	107, 999	—	—

n – сайт узнавания данной рестриктазы в последовательности отсутствует

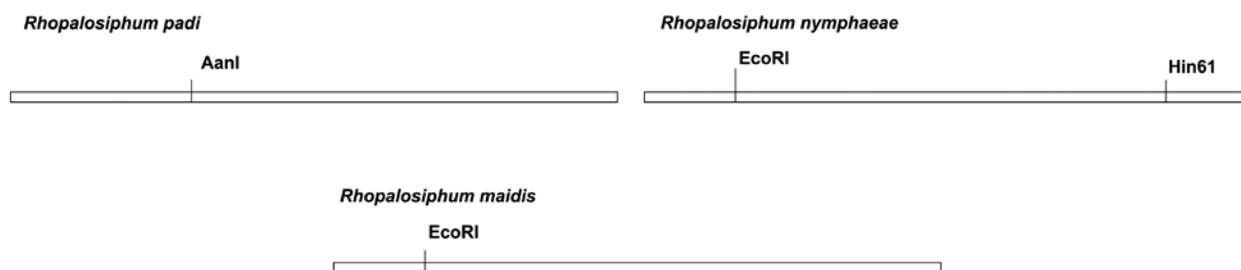


Рис. 2. Сравнительные рестрикционные карты последовательности гена *EF1a* тлей рода *Rhopalosiphum* Koch, развивающихся на картофеле и злаках

Отчасти это зависело от количества видов одного рода, включенных в анализ. Большое количество видов в роде *Aphis* потребовало привлечения большего числа ферментов рестрикции для создания уникального ключа для каждого из видов. Другим аспектом, влияющим на количество предлагаемых ферментов, было различие в степени консервативности последовательности *EF1a* в разных родах тлей. Поскольку из анализа были почти полностью изъяты рестриктазы, сайты узнавания которых локализовались в интронах гена, полиморфизм расположения сайтов рестрикции одних и тех же рестриктаз в последовательностях разных видов был ограничен высокой консервативностью нуклеотидной последовательности экзонов гена *EF1a* у тлей [16]. Так в роде *Macrosiphum* и близком к нему роде *Schizaphis* большинство рестриктаз у разных видов тлей имели сайты узнавания в идентичных позициях последовательности. Тем не менее, для всех исследованных родов, используя предложенную таблицу, можно составить ключ, состоящий из двух-трех ферментов рестрикции, который позволит дифференцировать целевые виды тлей.

Заключение

Последовательность гена *EF1a* у тлей оказалась достаточно информативной для создания ПДРФ-ключей для идентификации видов, в том числе, принадлежащих к одному роду. Даже при исключении из анализа ферментов, сайты узнавания которых локализируются в интронах гена или близко к интрон-экзонной границе, а также так называемых мелкощепящих рестриктаз, вариабельность картины расположения сайтов рестрикции на последо-

вательности гена *EF1a* у тлей всех задействованных в исследовании родов оказалась достаточной для создания идентификационной ПЦР-ПДРФ-таблицы.

ПЦР-ПДРФ-ключи, предполагающие одновременное использование двух-трех ферментов рестрикции для повышения точности получаемого результата, могут быть разработаны как для каждого рода в отдельности, так и для близких видов, ассоциированных с конкретными кормовыми растениями. В ряде случаев оправдан именно такой подход, что связано с приуроченностью большинства видов тлей к конкретному перечню кормовых растений, во-первых, и частой направленностью работ в области карантина и защиты растений на изучение и мониторинг численности вредителей конкретных культур, во-вторых.

Данные факты позволяют заключить, что метод идентификации видов на основе ПЦР-ПДРФ-ключей может оказаться полезным инструментом при работе с тлями – вредителями сельскохозяйственно-ценных и иных возделываемых культур растений.

Авторы выражают искреннюю благодарность доктору биологических наук, профессору С.В. Буге за предоставленные образцы насекомых, кандидату биологических наук В.П. Курченко, доктору биологических наук, профессору В.А. Прокулевичу и заведующей лабораторией биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ М.И. Потаповичу за помощь в проведении исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта № Б13-062 Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

Список использованных источников

1. Fauna Europaea: Fauna Europaea version 2.6. [Electronic resource] / Stichting Academisch Rekencentrum Amsterdam (SARA). – Mode of access: <http://www.faunaeur.org>. – Date of access: 10.11.2013.
2. Grain aphid clones vary in frost resistance, but this trait is not influenced by facultative endosymbionts / P. Lukasik [et al.] // *Ecological Entomology*. – 2011. – Vol. 36, Iss. 6. – P. 790–793.
3. Shufran, K.A. Genetic changes within an aphid clone: homogenization of rDNA intergenic spacers after insecticide selection / K.A. Shufran, Z.B. Mayo, T.J. Crease // *Biological Journal of the Linnean Society*. – 2003. – Vol. 79. – P. 101–105.
4. Жукова, М.И. Тли на картофеле в Беларуси и средства борьбы с ними / М.И. Жукова // *Ахова раслін*. – 2000. – № 4. – С. 16–18.
5. Molecular and morphometric data indicate a new species of the aphid genus *Rhopalosiphum* (Hemiptera: Aphididae) / I. Valenzuela [et al.] // *Ann. Entomol. Soc. Am.* – 2009. – Vol. 102(6). – P. 914–924.
6. Molecular phylogeny reveals the existence of two sibling species in the aphid pest *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera: Aphididae) / J. Piffaretti [et al.] // *Zoologica Scripta*. – 2012. – Vol. 41 – P. 266–280.
7. Evidence of superclones in Australian cotton aphid *Aphis gossypii* Glover (Aphididae: Hemiptera) / Y. Chen [et al.] // *Pest Manag. Sci.* – 2013. – Vol. 69. – P. 938–948.
8. Воронова, Н.В. Морфологическая и экологическая гетерогенность в комплексе *Macrosiphum gei* Koch, 1855 (Rhynchotha: Homoptera: Aphididae) / Н.В. Воронова, С.В. Буга // *Вестник Могилевского государственного университета им. А.А. Кулешова*. – 2010. – № 1(35). – С. 89–99.
9. Воронова, Н.В. Пример адаптационного полиморфизма у тлей, принадлежащих к комплексу *Macrosiphum rosae/knautiae/silvaticum* (Rhynchotha: Homoptera: Aphididae) / Н.В. Воронова, С.В. Буга // *Вестник Гродненского государственного университета им. Я. Купалы. Серия 5*. – 2011. – № 1(112). – С. 111–117.
10. Шапошников, Г.Х. Динамика клонов, популяций и видов и эволюция / Г.Х. Шапошников // *Журнал общей биологии*. – 1978. – Т. XXXIX, № 1. – С. 15–33.
11. Шапошников, Г.Х. Морфологическая дивергенция и конвергенция в эксперименте с тлями / Г.Х. Шапошников // *Энтомологическое обозрение*. – 1965. – Т. 44, Вып. 1. – С. 3–25.
12. Вредители сельскохозяйственных культур и лесных насаждений: в 3 т. / под общ. ред. В.П. Васильева. – 2-е изд. – Киев: Урожай, 1987. – 3 т.
13. Biological identifications through DNA barcodes / P.D.N. Hebert [et al.] // *Proc. R. Soc. Lond. B*. – 2003. – Vol. 270. – P. 313–321.
14. Zand, A.J. Determining morphological behaviors and genetic variety of rose aphids using RAPD and RFLP-PCR molecular markers / A.J. Zand, S. Gavanji // *Int. J. Agri Crop Sci.* – 2013. – Vol. 5 (5). – P. 487–492.
15. Identification of aphid species (Hemiptera: Aphididae: Aphidinae) using a rapid polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method based on the cytochrome oxidase subunit I gene / I. Valenzuela [et al.] // *Australian Journal of Entomology*. – 2007. – Vol. 46. – P. 305–312.
16. Вариабельность структуры и нуклеотидного состава гена *EF1a* у тлей (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphidoidea) / Н.В. Воронова [и др.] // *Труды БГУ*. – 2013. – Т. 8, Ч. 1. – С. 183–192.
17. Воронова, Н.В. Эффективность использования маркеров с ядерной локализацией в филогенетических исследованиях тлей (Rhynchotha; Homoptera: Aphididae) / Н.В. Воронова, В.П. Курченко, С.В. Буга // *Доклады НАН Беларуси*. – 2011. – Т. 55, № 6, – С. 87–92.
18. Воронова, Н.В. Подбор молекулярно-генетических маркеров для видовой диагностики тлей и построения филогенетических систем / Н.В. Воронова, В.П. Курченко, С.В. Буга // *Труды Белорусского государственного университета*. – 2011. – Т. 6, Ч. 1. – С. 181–192.
19. GenBank / D.A. Benson [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – Vol. 36. – Database issue D25–D30. doi:10.1093/nar/gkm929.
20. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T.A. Hall // *Nucleic acids symposium series*. – 1999. – N. 91. – P. 95–98.
21. Holman, J. Host plant catalog of aphids. Palaearctic region / J. Holman. – Berlin: Springer Science, 2009. – 1216 p.

Дата поступления статьи 14 мая 2014 г.

РЕФЕРАТЫ**SUMMARIES****УДК 577.21:631.524.01:635.64**

Разработка молекулярных маркеров для ДНК-идентификации аллельного состава генов, контролирующих тип роста и развитие боковых побегов томата (*Solanum lycopersicum* L.) / Н.А. Некрашевич [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 7–12. – Соавт.: К.К. Яцевич, С.В. Малышев, О.Г. Бабак, А.В. Кильчевский.

Разработаны молекулярные кодоминантные маркеры для ДНК-типирования аллельного состава генов *Self-pruning*, *Blind* и *Lateral suppressor*, контролирующих тип роста и развитие боковых побегов у томата. Выявлены линии с ценными мутантными аллелями *sp*, *ls¹*, *ls²*, *bl-1* и *bl-2 (to-2)* для использования в селекции сортов и гибридов с ограниченным развитием боковых побегов.

Ключевые слова: томат, молекулярные маркеры, ДНК-анализ, тип роста, боковые побеги.

Molecular Markers Development for DNA-Identification of Allelic Composition of the Genes Controlling the Type of Growth and Development of Lateral Shoots in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) / N.A. Nekrashevich [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 7–12. – К.К. Yatsevich, S.V. Malyshev O.G. Babak, A.V. Kilcheuski.

Molecular codominant markers for DNA typing of the allelic composition of *Self-pruning*, *Blind* and *Lateral suppressor* genes, determining the type of growth and development of tomato lateral shoots, were developed. The lines with valuable mutant alleles *sp*, *ls1*, *ls2*, *bl-1* and *bl-2 (to-2)* were identified for the use in breeding of tomato varieties and hybrids with limited development of lateral shoots.

Key words: tomato, molecular markers, DNA-analysis, growth type, lateral shoots.

УДК 633.1:631.527:575

Привалов, Ф.И. Основные результаты и перспективы использования биотехнологии в селекции сельскохозяйственных культур / Ф.И. Привалов, Э.П. Урбан, С.И. Гордей // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 13–24.

В статье изложены теоретические и практические результаты использования генетических и биотехнологических методов в процессе создания новых форм и сортов сельскохозяйственных культур: люпина желтого, озимого тритикале, голозерного овса, яровой пшеницы, эспарцета песчаного, озимой ржи. Отмечены основные направления и перспективы дальнейшего развития биотехнологии в селекции растений.

Ключевые слова: биотехнология, генетика, селекция, сорт.

Pryvalau, F.I. The Basic Results and Prospects of Biotechnology Use in Breeding of Agricultural Crops / F.I. Pryvalau, E.P. Urban, S.I. Hardzei // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 13–24.

The article presents the theoretical and practical results of using genetic and biotechnological methods in the development of new forms and cultivars of agricultural crops: yellow lupine, winter triticale, naked oat, spring wheat, sandy sainfoin, winter rye. The basic trends and prospects of the further biotechnology development in plant breeding are noted.

Key words: biotechnology, genetics, breeding, variety.

УДК 633.854.54:631.527

Использование доминантных мультилокусных маркеров для оценки генетического разнообразия льна масличного / С.И. Вакула [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 25–34. – Соавт.: Н.В. Анисимова, В.В. Титок, А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева.

Для оценки общего генетического разнообразия и генетических связей сортов коллекции льна масличного использованы две системы доминантных мультилокусных ДНК-маркеров – RAPD и ISSR. Более высокий уровень выявляемого полиморфизма, индекс информативности и эффективное число аллелей отмечен для RAPD-ПЦР и ISSR-маркеров к тринуклеотидным повторам генома. Обе маркерные системы генерируют кластерные дендрограммы сходной топологии, но с определенными отличиями – при построении максимально согласованного суб-дерева (MAST) RAPD и ISSR межсортовые дистанции совпали для 44% образцов коллекции льна.

Ключевые слова: лен масличный, полиморфизм, генетическое разнообразие, ДНК-маркер, RAPD, ISSR.

The Use of Dominant Multilocus Markers for Assessment of Flaxseed Genetic Diversity / S.I. Vakula [et al.] // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 25–34. – N.V. Anisimova, V.V. Titok, A.V. Kilcheuski, L.V. Khotyleva.

RAPD and ISSR, two dominant multilocus marker systems, were compared in terms of their informativeness and efficiency in the study of genetic diversity and relationships among 25 flaxseed genotypes. RAPD-PCR and 3-nucleotide motifs ISSR exhibited a higher level of polymorphism, an index of informative value and an effective number of alleles. Both marker systems generated cluster dendrograms of similar topologies but with certain differences – under the most consistent sub-tree (MAST) construction, intervarietal distances coincided only for 11 genotypes of flax.

Key words: flaxseed, polymorphism, genetic diversity, DNA-marker, RAPD, ISSR.

УДК 575.2:577.2

Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений / А.Н. Рабокоть [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр.* – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 35–44. – Соавт.: А.Е. Демкович, Я.В. Пирко, Я.Б. Блюм.

В статье описана одна из современных систем молекулярных маркеров, основанная на анализе полиморфизма длины интронов генов β -тубулина растений (tubulin-based polymorphism (TBP)). Рассмотрен международный опыт и собственные результаты использования TBP-анализа на различных видах травянистых и древесных растений. Показана высокая эффективность использования TBP-метода для дифференциации различных генотипов, что может быть весьма полезным в области молекулярной генетики растений.

Ключевые слова: молекулярно-генетические маркеры, интрон, β -тубулин, TBP (tubulin base polymorphism).

Intron Length Polymorphism of β -tubulin Gene as an Effective Tool for Genotyping of Plants / A.N. Rabokon [et al.] // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 35–44. – A.Ye. Demkovych, Ya.V. Pirko, Ya.B. Blume.

The article describes one of the modern systems of molecular markers based on intron length polymorphism analysis of the β -tubulin gene of plants (tubulin-based polymorphism (TBP)). The international experience and our own results of using the TBP analysis were considered for different species of herbaceous and woody plants. The high efficiency of the TBP method was shown for the differentiation of different genotypes that can be very useful in the field of plant molecular genetics.

Key words: molecular-genetic markers, intron, β -tubulin, TBP (tubulin-based polymorphism).

УДК 577.21:633.111.1

Изучение аллельного разнообразия *TaCwi-1* локуса в коллекции сортов и линий озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Е.А. Фомина [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 45–52. – Соавт.: С.Н. Куликович, С.В. Малышев, О.Ю. Урбанович.

Исследование полиморфизма локуса *TaCwi-1* у сортов и линий пшеницы, используемых в белорусской селекции, представляет значительный практический интерес, поскольку данный

ген оказывает влияние на массу тысячи зерен, что способствует повышению урожайности зерна. В результате проведенного ПЦР-анализа коллекции, состоящей из 79 сортов и линий озимой пшеницы, было выявлено, что большинство сортов и линий (88,6%) содержат *TaCwi-A1a* аллель, обеспечивающий более высокую массу тысячи зерен. Сравнение полученных данных об аллельном составе локуса *TaCwi-A1* с данными о фактической массе тысячи зерен показало, что масса тысячи зерен у сортов Акорд, Acratos, Catalus и FT Wonder, несущих аллель *TaCwi-A1b*, присутствие которого должно приводить к снижению данного показателя, оказалась выше средней для изученного коллекционного материала. Вероятно, проявление данного признака может компенсироваться другими генами.

Ключевые слова: озимая пшеница, *TaCwi-A1* локус, масса тысячи зерен, урожайность зерна.

The Study of Allelic Diversity of the *TaCwi-A1* Locus in the Collection of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties and Lines / E.A. Fomina [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 45–52. – S.N. Kulinkovich, S.V. Malyshev, O.Yu. Urbanovich.

Investigation of polymorphism of the *TaCwi-A1* locus in wheat varieties and lines used in the Belarusian breeding is of a considerable practical interest, because this gene has an effect on the thousand grain weight, thereby increasing grain yield. PCR analysis of the collection, consisting of 79 winter wheat varieties and lines, has revealed that most of the varieties and lines (88.6%) contains the *TaCwi-A1a* allele providing the higher thousand grain weight. Comparison of the obtained data on the allelic composition of the *TaCwi-A1* locus with the data on the actual thousand grain weight has shown that the thousand grain weight in the cultivars Akord, Acratos, Catalus and FT Wonder, carrying the *TaCwi-A1b* allele the presence of which should lead to a decrease in this index, turned out higher than the average for the studied collection material. Probably, the manifestation of this trait can be compensated by other genes.

Key words: winter wheat, *TaCwi-A1* locus, thousand grain weight, grain yield.

УДК 577.21;601;633:631.52

Межнина, О.А. Изучение генетического разнообразия земляники садовой (*Fragaria ananassa*), выращиваемой в Республике Беларусь / О.А. Межнина, О.Ю. Урбанович // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 53–58.

Для успешной реализации селекционных программ большое значение имеет идентификация генотипов как сортов, так и гибридов, а также исходных форм. Сорты земляники имеют значительное внешнее сходство, что затрудняет их идентификацию по фенотипическим признакам. В связи с этим все большее значение приобретает разработка эффективных и надежных методов оценки генетического разнообразия сортов с использованием молекулярных маркеров.

Молекулярное исследование геномов сортов земляники садовой, выращиваемых в Беларуси, показало, что они характеризуются невысоким генетическим разнообразием. SSR-анализ показал тесную генетическую связь изученных сортов селекции Беларуси, России, Германии, Польши и других стран. Тем не менее, анализ 4 локусов микросателлитных последовательностей среди 49 сортов земляники садовой позволил выявить 49 различных генотипов. Для более детальной характеристики генотипов земляники садовой планируется привлечь дополнительные молекулярные маркеры и оценить их эффективность для целей ДНК-идентификации.

Ключевые слова: земляника садовая, генетическое разнообразие, SSR-маркеры, ДНК-типирование.

Mezhnina, O.A. The Study on Genetic Diversity of Strawberry (*Fragaria ananassa*), Grown in the Republic of Belarus / O.A. Mezhnina, O.Yu. Urbanovich // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 53–58.

For the successful implementation of breeding programs, the identification of genotypes of both cultivars and hybrids as well as of original forms is of great importance. Strawberry varieties show strong phenotypic resemblance that complicates their identification by phenotypic characters. Thereby

it is increasingly important to develop efficient and reliable methods of assessing genetic diversity of varieties by using molecular markers.

The molecular study on genomes of strawberry varieties grown in Belarus has shown that they are characterized by low genetic diversity. SSR-analysis has shown a close genetic relationship of the studied varieties of breeding in Belarus, Russia, Germany, Poland and other countries. However, the analysis of the 4 loci of microsatellite sequences among 49 strawberry varieties allowed us to identify 49 different genotypes. For a more detailed characterization of strawberry genotypes, it is planned to involve additional molecular markers and to evaluate their effectiveness for the purposes of DNA identification.

Key words: strawberry, genetic diversity, SSR markers, DNA-typing.

УДК 61:575

Частоты встречаемости аллельных полиморфизмов генов *ADRB2*, *FABP2*, *PPARG*, *FTO*, *ADRB3* и *APOA2* среди коренного населения Казахстана / Н.С. Сихаева [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 59–63. – Соавт: Ж.М. Джармуханов, Е.В. Жолдыбаева, Е.М. Раманкулов.

Для понимания генетической предрасположенности к развитию метаболического синдрома (МС) следует обратить внимание на некоторые гены метаболизма, а также гены-кандидаты сахарного диабета такие, как *ADRB2*, *FABP2*, *PPARG*, *FTO*, *ADRB3* и *APOA2*. Генетические различия в любом из этих генов могут изменять черты метаболического синдрома. Частоты встречаемости генов предрасположенности к развитию МС хорошо изучены среди европейских жителей, однако население Средней Азии изучено слабо. Следует отметить, что частоты встречаемости аллельных вариантов гена могут зависеть от расовой и этнической принадлежности. Частоты аллелей (Minor Allele Frequency) исследуемых генов для населения Казахстана были следующими: rs1042713 (G>A) 0,425; rs1799883 (C>T) 0,618; rs1801282 (C>G) 0,849; rs1801282 (C>G) 0,849; rs3751812 (G>T) 0,615; rs4994 (A>G) 0,834.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, частоты встречаемости, распределение генотипов, коренное население Казахстана.

The Occurrence Frequencies of Allele Polymorphisms in *ADRB2*, *FABP2*, *PPARG*, *FTO*, *ADRB3* and *APOA2* Genes among the Indigenous Population of Kazakhstan / N.S. Sikhayeva [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 59–63. – Zh.M. Dzhar-mukhanov, E.V. Zholdybayeva, E.M. Ramankulov.

For understanding the genetic predisposition to metabolic syndrome (MS) attention should be paid to some genes, such as *ADRB2*, *FABP2*, *PPARG*, *FTO*, *ADRB3* and *APOA2*. Genetic differences in any of these genes can affect metabolic syndrome features. The occurrence frequencies of predisposition genes to MS development were well studied in the European populations, but the populations of Central Asia were poorly studied. It should be noted that the occurrence frequencies of allelic variants of the gene may depend on race and ethnicity. The allele frequencies (MAF – Minor Allele Frequency) of the investigated genes for the Kazakh population were as follows: rs1042713 (G>A) 0,425; rs1799883 (C>T) 0,618; rs1801282 (C>G) 0,849; rs1801282 (C>G) 0,849; rs3751812 (G>T) 0,615; rs4994 (A>G) 0,834.

Key words: mononucleotide polymorphism, occurrence frequencies, genotype distribution, Kazakh population.

УДК 575.174.2

Генетическое тестирование мутаций *BRCA1*, *BRCA2* и *CHEK2* у пациенток с первично-множественным раком молочной железы / В.Н. Мартинков [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 64–68. – Соавт: А.Е. Силин, Э.А. Надьров, И.Б. Тропашко, А.А. Силина, С.М. Мартыненко.

Проведено генетическое тестирование 849 пациенток с диагнозом «рак молочной железы» на наличие наиболее распространенных мутаций генов *BRCA1* (185delAG, 300T>G, 4153delA,

5382insC), *BRCA2* (6174delT) и *CHEK2* (1100delC). Установлено статистически значимое увеличение суммарной частоты мутаций генов *BRCA1*, *BRCA2* в группе из 82 пациенток с первично-множественным раком молочной железы (28,0%) по сравнению с группой из 767 пациенток с одной первичной опухолью молочной железы (8,9%), различия между группами по частоте мутации 1100delC гена *CHEK2* были статистически незначимы.

Ключевые слова: рак молочной железы, наследственная предрасположенность, генетическое тестирование, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*.

Genetic Testing for Mutations of *BRCA1*, *BRCA2* and *CHEK2* in Patients with Multiple Primary Breast Cancer / V.N. Martinkov [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 64–68. – A.E. Silin, E.A. Nadyrov, I.B. Tropashko, A.A. Silina, S.M. Martynenko.

The genetic testing of the most widespread mutations of *BRCA1* (185delAG, 300T>G, 4153delA, 5382insC), *BRCA2* (6174delT) and *CHEK2* (1100delC) genes was performed in 849 patients with breast cancer diagnosis. A statistically significant increase in the total frequency of mutations of genes *BRCA1*, *BRCA2* was observed in the group of 82 patients with multiple primary breast cancer (28.0%) as compared with a group of 767 patients with a single primary breast tumor (8.9%), the differences between the groups in the frequency of mutation 1100delC of the gene *CHEK2* were statistically insignificant.

Key words: breast cancer, genetic predisposition, genetic testing, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*.

УДК 599.323.4:576.3151.316

Влияние климатических изменений в послеледниковье на ареалы хромосомных рас обыкновенной бурозубки, *Sorex araneus* L. (Mammalia) в Беларуси / Ю.М. Борисов [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 69–78. – Соавт: Е.В. Черепанова, И.А. Кришук, Е.С. Гайдученко, М.Е. Никифоров, О.О. Григорьева, В.Н. Орлов.

Исследовано распространение робертсоновских транслокаций, диагностических для хромосомных рас обыкновенной бурозубки, *Sorex araneus*, в бассейне верхнего Днепра и Припяти. В результате выявлены частотные клины метацентриков четырех хромосомных рас, Białowieża, Западная Двина, Нерусса и Киев, различающихся между собой по 3–5 метацентрикам неполной гомологии. Расы Западная Двина и Нерусса характеризуются мономорфным метацентрическим кариотипом почти на всей протяженности их ареалов. Возникновение клин метацентриков на территории Беларуси могло быть обусловлено гибридизацией между метацентрическими расами и акроцентрической расой. Вероятно, хромосомная раса с акроцентрическим кариотипом существовала ранее в бассейне верхнего Днепра; в плейстоцене она была изолирована от метацентрических рас. В конце плейстоцена – начале голоцена, в результате потепления и восстановления единого ареала обыкновенной бурозубки, метацентрические расы вступили в контакт с акроцентрической расой. Распространение метацентриков четырех рас по ареалу популяций с акроцентрическим кариотипом привело к формированию множественных клин метацентриков и к исчезновению акроцентрической расы. При анализе гаплотипов гена *cyt b* филогеографическая подразделенность исследуемых популяций не коррелировала с их кариологическими особенностями.

Ключевые слова: *Sorex araneus*, робертсоновские транслокации, полиморфизм, послеледниковье, климатические изменения.

The Influence of Postglacial Climatic Changes on Distribution Ranges of Chromosomal Races of Common Shrew, *Sorex araneus* L. (Mammalia) in Belarus / Yu. M. Borisov [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 69–78. – E.V. Cherepanova, I.A. Kryshchuk, H.S. Gaiduchenko, M.E. Nikiforov, O.O. Grigoryeva, V.N. Orlov.

The distribution pattern of race-specific Robertsonian translocations of the common shrew, *Sorex araneus*, in the Dniper and Pripjat basin was studied. The frequency clines of

Robertsonian metacentrics, specific for four chromosomal races: Białowieża, West Dvina, Neroosa, and Kiev, differing from each other in 3-5 metacentrics of monobrachial homology, were revealed.

The West Dvina and Neroosa are characterized by the monomorphic metacentric karyotype along the whole length of their distribution range. The appearance of the clinal variation of metacentrics in Berarusian populations might be caused by hybridization between metacentric races and an acrocentric one. Probably, a chromosomal race with the acrocentric karyotype existed earlier in the basin of the upper Dnieper basin; this race was isolated from the metacentric races at Pleistocene. At late Pleistocene – early Holocene, due to climatic changes and restoration of a single range of the common shrew, the metacentric races came into contact with the acrocentric ones. The spread of metacentrics of four races along the distribution range of the populations with the acrocentric karyotype has led to formation of multiple metacentric clines and to extinction of the acrocentric race.

Key words: *Sorex araneus*, Robertsonian translocations, polymorphisms, postglacial period, climatic changes.

УДК 636.1.575::576.3:619.612.017

Ткачѳв, А.В. Цитогенетический статус жеребцов под влиянием допустимых уровней микотоксинов корма / А.В. Ткачѳв // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 79–83.

В статье представлены результаты исследований влияния максимально допустимых концентраций микотоксинов корма на показатели цитогенетического статуса жеребцов-производителей украинской верховой, тракненской, вестфальской и арабской пород, разводимых в Украине. После получения корма с максимально допустимым уровнем зearаленона, Т-2 токсина, дезоксиниваленола и афлатоксина процент метафаз с абберациями в среднем увеличился у украинской верховой породы на 2,4% ($p < 0,05$), тракненской породы – на 1,6% ($p < 0,001$), арабской породы – на 1,4% ($p < 0,01$), вестфальской породы – на 1,2% ($p < 0,001$). Общее количество аббераций у жеребцов вестфальской породы в среднем увеличилось на 37,7% ($p < 0,001$), у арабской породы – на 36,8% ($p < 0,001$), у тракненской породы – на 18,8% ($p < 0,001$), у украинской верховой – на 23,8%. Полученные данные позволяют говорить о необходимости ограничения сроков кормления жеребцов-производителей кормом с максимально допустимыми уровнями микотоксинов в связи с их генотоксическим эффектом при хроническом токсикозе.

Ключевые слова: соматическая хромосомная нестабильность, микотоксины корма, жеребцы.

Tkachev, A.V. The Cytogenetic Status of Stallions under the Influence of Permissible Mycotoxin Levels in Feed / A.V. Tkachev // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 79–83.

This article highlights the experimental research results of the influence of the maximum allowable mycotoxin concentrations on the cytogenetic status indices of the stallions of the Ukrainian saddle horses, Trakenensky, Westphalian and Arabian breeds reared in the Ukraine. After receiving the feed with the maximum allowable level of zearalenone, T-2 toxin, desoxynivalenol and aflatoxin the percentage of metaphases with aberrations increased on the average in the Ukrainian saddle horse breed by 2,4% ($p < 0,05$), Trakenensky breed – by 1,6% ($p < 0,001$), the Arabian breed – by 1,4% ($p < 0,01$), and the Westphalian breed – by 1,2% ($p < 0,001$). The total number of aberrations in stallions of the Westphalian breed increased on the average by 37,7% ($p < 0,001$), in the Arabian breed – by 36,8% ($p < 0,001$), in the Trakenensky breed – by 18,8% ($p < 0,001$), in the Ukrainian saddle horses – by 23,8%. The obtained data suggest the need to limit the terms of feeding stallions with the maximum allowable mycotoxin level due to their genotoxic effect under chronic toxicosis.

Key words: somatic chromosomal instability, feed mycotoxins, stallions.

УДК 577.21:636.23.082.2

Белая, Е.В. Межпородный сравнительный анализ ассоциации гена каппа-казеина с признаками молочной продуктивности у коров голштинской и черно-пестрой пород / Е.В. Белая, М.Е. Михайлова // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 84–89.

Проведен межпородный анализ ассоциации гена каппа-казеина с признаками молочной продуктивности у коров голштинской и белорусской черно-пестрой пород. Установлено, что по признаку удоя и белковомолочности, предпочтительным у коров голштинской породы является генотип *bCSN3^{BB}* в то время как у коров черно-пестрой породы предпочтительным является генотип *bCSN3^{AA}*. Ассоциация данного генотипа с удоём и белковомолочностью является статистически значимой у голштинских коров. Это позволяет рекомендовать его в качестве генетического маркера для селекционных программ.

Ключевые слова: генетический маркер, молочная продуктивность, белорусский черно-пестрый скот, голштинский скот, каппа-казеин.

Belaya, E.V. The Interpedigree Comparative Analysis of the Association of Kappa-casein Gene with Milk Productivity Traits in Holstein and White-and-black Cattle Breeds / E.V. Belaya, M.E. Mikhailava // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 84–89.

The interbreeding analysis of the association of kappa-casein gene with milk productivity traits was conducted in Holstein and Belarusian white-and-black cattle. It was established that genotype *bCSN3^{BB}* was preferable for milk yield and milk protein productivity in Holstein cows while genotype *bCSN3^{AA}* was preferable in white-and-black ones. The association of the genotype with milk yield and the productivity of milk protein is statistically significant in Holstein cows. This allows us to recommend it as a genetic marker for breeding programs.

Key words: genetic marker, milk productivity, the Belarusian black-and-white cattle, Holstein cattle, kappa-casein.

УДК 598.619:575.17

Генетическое разнообразие и дифференциация популяций тетерева Белорусского и Украинского Полесья / К.В. Гомель [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 90–99. – Соавт.: Т.Е. Павлющик, М.А. Павловская, М.Е. Никифоров.

В данной статье проводится анализ генетического разнообразия и дифференциации популяций тетерева, населяющих территорию Полесья. Сравнение ведется отдельно для популяций тетерева Белорусского Полесья, а также между популяциями тетерева Белорусского и Украинского Полесья. В качестве маркеров генетического разнообразия и генетической дифференциации популяций были выбраны микросателлиты (9 полиморфных локусов). Анализ полиморфизма микросателлитных локусов показал, что генетическое разнообразие популяций тетерева на территории Полесья характеризуется достаточно высоким уровнем. Полученные результаты являются научной основой для проведения дополнительных охранных мероприятий по сохранению данного вида в Беларуси.

Ключевые слова: тетерев, генетическое разнообразие, Белорусское и Украинское Полесье.

Genetic Diversity and Differentiation of Black Grouse Populations from Belarusian and Ukrainian Polesye / K.V. Homel [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2015. – P. 90–99. – T.E. Pavlushchik, M.A. Pavlovska, M.E. Nikiforov.

The article presents analysis of genetic diversity and differentiation of black grouse populations from Polesye. We compared black grouse populations within Belarusian Polesye and also black grouse populations between Belarusian and Ukrainian Polesye. The microsatellites (9 polymorphic loci) were taken as markers of genetic diversity and differentiation of populations. The polymorphism analysis of microsatellite loci has shown that genetic diversity of populations from Polesye is characterized by a very high level. The obtained results are a scientific basis to carry out additional protective measures for conservation of black grouse in Belarus.

Key words: Black grouse, genetic diversity, Belarusian and Ukrainian Polesye.

УДК 577.212.3:595.753

Воронова, Н.В. Разработка ПЦР-ПДРФ таблиц на основе последовательности гена *EF1a* для идентификации видов тлей – вредителей сельскохозяйственных растений / Н.В. Воронова, В.И. Головенчик // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 19. – Минск, 2015. – С. 100–109.

Предложены ПЦР-ПДРФ ключи, разработанные на основе последовательности гена *EF1a*, для идентификации 26 видов тлей фауны Беларуси. Перечень видов включает вредителей сельскохозяйственных и других культивируемых растений из родов *Aphis*, *Acyrtosiphon*, *Macrosiphum*, *Mysus*, *Megoura*, *Rhopalosiphum*, *Schizaphis*.

Ключевые слова: тли, вредители сельскохозяйственных растений, идентификация видов, ПДРФ, *EF1a*.

Voronova, N.V. PCR-RFLP Keys for Aphid Species Identification Based on Sequences of *EF1a* Gene / N.V. Voronova, V.I. Golovenchik // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 19. – Minsk, 2014. – P. 100–109.

PCR-RFLP keys based on the gene sequence *EF1a* were developed to identify 26 aphid species of Belarusian fauna. The species list includes some pests of cultivated plants from the genera *Aphis*, *Acyrtosiphon*, *Macrosiphum*, *Mysus*, *Megoura*, *Rhopalosiphum*, *Schizaphis*.

Key words: aphid, pests of agricultural plants, species identification, RFLP, *EF1a*.

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. 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 19

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*
Переводчик *Г.А. Мартысь*
Верстка *Е.А. Клевец*
Корректор *И.В. Широкая*
Технический редактор *Е.А. Клевец*

Подписано в печать 14.09.2015. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 13,95. Уч.изд. л. 8,45. Тираж 100 экз. Заказ №500/1.
Отпечатано в типографии ООО «КолоритПАК»

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