

Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ
ГЕНЕТИКА**

Научные труды

Том 6, 2007

Минск
2007

УДК 577.21 (082)+631.52

ББК 28.04 я43

M75

Редакционная коллегия:

Главный редактор: **А.В. Кильчевский.**

Заместители главного редактора: **И.Д. Вологовский, Н.А. Картель.**

Ответственный секретарь: **В.А. Лемеш.**

Члены редколлегии: **А.С. Владыко, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенко,
А.Г. Лобанок, В.Н. Решетников, С.А. Усанов, Л.В. Хотылева.**

Молекулярная и прикладная генетика : науч. тр. Т. 6 /
M75 ред.кол.: А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2007. – 120 с.

В сборник включены статьи, написанные по тематике.

УДК 577.21 (082) +631.52
ББК 28.04 я43

Тексты публикуются в авторской версии без редакционных изменений
Articles are publishing in author's version without editorial changes

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-------|
| <i>Л.В. Хотылева</i> Академик Н.В. Турбин – организатор и первый директор Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. | 5 |
| <i>А.В. Кильчевский</i> Генетические основы селекции растений. | 13 |
| <i>А. И. Емец, А. Ю. Ныпорко, Я. Б. Блюм</i> Геномика микротрубочек как инструмент для биотехнологии растений. | 22 |
| <i>И.П. Шейко, Т.И. Епишко</i> Перспективы использования ДНК-технологий в селекционной работе животноводства Беларуси. | 37 |
| <i>О.Г. Давыденко, Е.И. Кушнеревич, Л.Н. Сивицкая, Н.Г. Даниленко</i> Этногеномика белорусского народа. Предварительные итоги. | 45 |
| <i>В.С. Фадеев, Х.Р. Шимшилашвили, Д.В. Сотченков., Р.А. Комахин, М.М. Бабькин, В.В. Зинченко, И.В. Голденкова-Павлова</i> Новый подход для экспрессии гетерологичных генов в растениях с целью создания устойчивых форм растений. | 79 |
| <i>Н.А. Картель, С.В. Мальшев, О.Ю. Урбанович, Т.В. Долматович</i> ДНК-маркеры в генетике и селекции растений. | 81-91 |
| <i>А.П. Ермишин</i> Принципы и методы оценки риска генно-инженерной деятельности. | 92 |
| <i>А.И. Ковалевич, В.Е. Падутов, А.И. Сидор, О.Ю. Баранов</i> Селекционно-генетические основы рационального использования и сохранения лесных ресурсов. | 109 |
| РЕФЕРАТЫ | 114 |

CONTENTS

| | |
|--|-------|
| <i>L.V. Khotyleva</i> Academician N.V. Turbin – the founder and the first director of the Institute of Genetics and Cytology at the National Academy of Sciences of Belarus | 5 |
| <i>A. Kilchevsky</i> Genetics principles of plant breeding. | 13 |
| <i>Ya. B. Blum, A. I. Yemets, A. Yu. Nyporko</i> Microtubule genomics as tool for plant biotechnology | 22-36 |
| <i>I. Sheiko, T. Yepishko</i> Prospects of applying DNA-technologies in cattle-breeding in Belarus. | 37 |
| <i>O. Davydenko, E. Kushnerovich, L. Sivitskaya, N. Danilenko</i> Ethnogenomics of Belarusian. Preliminary results. | 45 |
| <i>V. Fadeev, X. Shimshilashvili, D. Sotchenkov, R. Komakhin, M. Babikin, V. Zinchenko, I. Goldenkova-Pavlova</i> A new approach to heterologic gene expression in plants for developing resistant plant forms. | 79 |
| <i>N. Kartel, S. Malyshev, O. Urbanovich, T. Dolmatovich</i> DNA-markers in genetics and breeding of plants. | 81 |
| <i>A. Ermishin</i> Principles and methods for estimating risk of gene-engineering activities | 92 |
| <i>A. Kovalevich, V. Padutov, A. Sidor, O. Baranov</i> Breeding-genetic principles of rational use and preservation of forest resources. | 109 |
| SUMMARIES | 114 |

Л.В. Хотылева

**АКАДЕМИК Н.В. ТУРБИН – ОРГАНИЗАТОР И ПЕРВЫЙ ДИРЕКТОР
ИНСТИТУТА ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ (ОБЗОР)**

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

Третьего декабря 2007 года исполняется 95 лет со дня рождения Николая Васильевича Турбина академика Национальной академии наук Беларуси и Российской сельскохозяйственной академии, выдающегося ученого генетика, основателя школы белорусских генетиков, создателя Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси и его первого директора.

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

В 1939 г. Н.В. Турбин поступает в докторантуру Академии наук СССР, которую проходит в лаборатории эволюционной экологии растений под руководством академика Б.А. Келлера, крупного ученого в области геоботаники и экологии растений.

В 1942 г. в Ашхабаде, будучи курсантом военно-медицинского училища, в возрасте 30 лет, Николай Васильевич успешно защищает докторскую диссертацию (это были годы Великой отечественной войны 1941-1945 гг.). После защиты Николай Васильевич в течение двух лет заведует отделом Московского ботанического сада Академии наук СССР и одновременно работает профессором в Московском областном педагогическом институте.

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

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

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

В 50–60-е годы XX столетия в Академии наук БССР начинается многостороннее развитие современных научных на-

правлений естественных наук, для чего в г. Минск на работу приглашаются известные ученые из ведущих научных центров и университетов СССР. В числе приглашенных для руководства Институтом биологии Академии наук БССР был и Николай Васильевич Турбин, который в 1953 г. избирается академиком Академии наук БССР.

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

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

В этот же период Николай Васильевич приглашает на работу и меня. После окончания аспирантуры и защиты кандидатской диссертации в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова и полутора лет работы на Кабардино-Балкарской селекционной станции по ге-

нетике кукурузы, я приехала на родину в Беларусь в надежде найти работу по специальности. Мне очень повезло, так как в это время в СССР началось повсеместное увлечение культурой кукуруза, как возможного укрепления кормовой базы животноводства. Академии наук БССР также поручили заняться решением этой проблемы. Узнав, что я защитила диссертацию по методам селекции кукурузы и имею возможность контактировать с селекционерами Союза, Н.В. Турбин пригласил меня на работу в свой отдел. Небольшой, но очень увлеченный и дружный коллектив отдела генетики с энтузиазмом включился в разработку генетических проблем. Жаркие споры, обсуждение каждой новой работы, поиски оригинальных путей решения поставленных задач, активное изучение английского языка (без этого уже было немислимо движение вперед) такой была атмосфера в отделе в те годы. Все с нетерпением ждали появления Николая Васильевича, ибо он обладал той завидной способностью щедро делиться богатством своих знаний, которая присуща одаренным людям, безгранично преданных своему делу.

Необходимость заниматься выращиванием кукурузы на многие годы определила основное научное направление Отдела генетики Института биологии АН БССР. Николай Васильевич направил наши усилия на решение в научном плане биологической проблемы гетерозиса (гибридной мощности), именно кукуруза была тем генетическим объектом, на котором решались многие теоретические вопросы, связанные с этим явлением и именно на кукурузе была показана перспектива использования гетерозиса для повышения продуктивности растений. Одновременно начались работы по изучению гетерозиса у томата, сахарной свеклы, зерновых культур.

За очень короткий срок, благодаря инициативе Николая Васильевича, Отдел генетики, в рамках которого были выполнены разносторонние генетические иссле-

дования, решением Президиума Академии наук СССР преобразовывается в 1965 г. в Институт генетики и цитологии Академии наук БССР и становится центром научных исследований по проблемам генетики в республике. Результаты, полученные к этому времени коллективом и доложенные Николаем Васильевичем и сотрудниками на различных форумах в СССР и за рубежом выдвигают Институт на передовые позиции.

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

В результате обобщения и критического анализа итогов собственных исследований и данных литературы Николай Васильевича предложил новую концепцию для объяснения причин гетерозиса, основанную на теории генетического баланса. Главная ценность этой концепции состоит в правильном подходе к выяснению причинно-следственных связей между наследственными факторами и контролируемыми признаками. Она выражает собой общий подход к объяснению причин гетерозиса и исходит из представления о разнонаправленном действии на развитие признака многих наследственных факторов. Согласно этой концепции, скрещивание линий, специально подобранных по комбинационной способности, образует гибриды, у которых число генов, вызывающих плюс-эффекты, существенно возрастает, а число генов с минус-эффектами уменьшается по сравнению с обеими родительскими формами. Изменение баланса в действии генов, стимулирующих развитие данного признака, проявляется в возрастании его количественного выражения, т.е. в виде гетерозисного эффекта.

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

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

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

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

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

Проблеме гетерозиса Н.В. Турбин придает всесоюзное звучание. Он организует проблемный совет по гетерозису и формирует всесоюзную программу, для участия в разработке которой приглашает ведущих генетиков и селекционеров страны. Институт признается центром генетических исследований по проблеме гетерозиса в СССР.

Разработан метод оценки эколого-генетических параметров генотипов, популяций и сред, который позволяет определить общую и специфическую адаптивную способность генотипов растений и их экологическую стабильность; дает возможность провести комплексную оценку среды как фона для отбора; расчленить фенотипическую вариацию популяции на варианты общей и специфической адаптивной способности и обоснованно выбирать направления адаптивной селекции. Цикл научных работ по экологической селекции растений удостоен в 2001 г. премии Национальной академии наук Беларуси (Кильчевский, Хотылева, 1989, 1997).

Совместно со своим учеником, ныне членом-корреспондентом НАН Беларуси В.Е. Бормотовым, Н.В. Турбин начинает исследования в области экспериментальной полиплоидии и гетерозиса. Создается первая в СССР коллекция тетраплоидных форм сахарной свеклы. На основе лучших тетраплоидных линий начато получение триплоидных гибридов, которые высеваются не только на полях Беларуси, но и в других республиках СССР. В процессе работы изучены особенности роста и развития тетраплоидных и триплоидных растений свеклы, дана характеристика их морфологических, анатомических и физиологических признаков, изучена цитогенетика полиплоидных форм. Н.В. Турбин высказывает мысль, что повышение продуктивности полиплоидных гибридов - это не только результат полиплоидии, но в большей степени повышение урожайности корнеплодов сахарной свеклы достигается за счет гетерозисного эффекта, возникающего при правильном подборе родительских компонентов. Результаты этих исследований опубликованы в книге В.Е. Бормотова и Н.В. Турбина «Экспериментальная полиплоидия и гетерозис у сахарной свёклы» (1972). Работы в этом направлении увенчались созданием и районированием ряда высокоурожайных и высокосахаристых триплоидных гибридов.

Теоретические и методические разработки по проблеме гетерозиса нашли широкое практическое использование при выведении гетерозисных гибридов в Беларуси и других странах СНГ. За цикл работ «Генетика гетерозиса и пути его использования в селекции растений» сотрудникам Института - Н.В. Турбину, Л.В. Хотылевой, В.Е. Бормотову, О.О. Кедрову-Зихман, В.К. Савченко, Е.А. Бычко, Л.Н. Каминской, Л.А. Тарутиной, Б.Ф. Матросову, А.И. Палилову в 1984 г. присуждена Государственная премия Республики Беларусь.

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

Государственной премии Республики Беларусь 2002 г.

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

По инициативе Н.В. Турбина, Р.И. Гончаровой была начата работа по изучению мутационного процесса, направленная на выявление антимуtagens, тормозящих естественный мутационный процесс, и использование химических веществ для защиты от генетического действия ионизирующих излучений. Были открыты антимуtagens среди лекарственных соединений сульфаниламидного ряда и новых антиоксидантов – производных 4-дигидропиридина, установлена зависимость антимугенной активности от химической структуры соединений, что послужило основой для разработки структурно-функционального подхода к поиску антимуtagens.

В связи с пуском в БССР атомного реактора Н.В. Турбин приступает к изучению генетической эффективности нейтронов промежуточных энергий. Совместно с профессором Н.А. Троицким на микроорганизмах, растениях, дрозофиле и мышцах исследована относительная биологическая эффективность нейтронного облучения и после проведенных экспериментов внесены соответствующие коррективы в нормативы радиационной защиты. Материалы этих исследований опубликованы Н.А. Троицким, Н.В. Турбиным и М.А. Арсеньевой в монографии «Генетические эффекты промежуточных нейтронов» (1971). При поддержке Николая Ва-

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

В 70-е годы в Институте получают развитие исследования по генетической трансформации растений, молекулярной генетике и биотехнологии. По инициативе Н.В. Турбина, сначала совместно с Институтом прикладной молекулярной биологии и генетики ВАСХНИЛ, а затем самостоятельно были развернуты исследования по генетической трансформации растений – совершенно новому в то время направлению мировой науки (Турбин и др., 1975). Для решения этих проблем в нашем институте была создана лаборатория молекулярной генетики под руководством академика Н.А. Картеля, одним из основных направлений которой являются исследования структурно-функциональной организации геномов и молекулярное картирование генов у сельскохозяйственных растений.

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

Сегодня спустя много лет со всей остротой просматриваются незаурядные способности и талант Николая Васильевича

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

Огромная эрудиция и большой научный опыт позволили Н.В. Турбину, наряду с теоретическими и экспериментальными трудами в области генетики и селекции растений, опубликовать ряд широко известных работ по вопросам видообразования, философским проблемам генетики, прогнозирования направлений и методов селекции растений. Так, одна за другой выходят его статьи: «Дарвинизм и новое учение о виде» (Ботанический журнал, 1952, т. 37, № 6), «О некоторых спорных вопросах теории видообразования» (Вестник ЛГУ, 1953, № 7), «Когда нечего сказать по существу» (Журнал общей биологии, 1953, т.15, № 3), «О современной концепции гена» (Вестник АН СССР, 1957, № 4), «О философских вопросах современной генетики» (Вопросы философии, 1958, № 2). Следует напомнить, что это было очень непростое время в отечественной биологии, поэтому каждая из названных публикаций представляет собой отражение общей ситуации в биологии. Так, в вышедшей в 1952 г. на страницах «Ботанического журнала» статье «О спорных вопросах теории видообразования», впервые, после печально знаменитой августовской 1948 г. сессии ВАСХНИЛ, прозвучала критика взглядов Т.Д. Лысенко, открывшая

дискуссию по вопросам видообразования. Не менее острой была статья «О философских вопросах современной генетики» (1958 г.), в которой Николай Васильевич по приглашению редколлегии журнала «Вопросы философии» и руководства Института философии Академии наук СССР выступил в защиту молекулярной биологии. Это новое по тем временам направление, получившее признание в мировой науке и успешно развивавшееся в научных центрах Запада, в нашей стране (бывшем Советском Союзе) было объявлено «псевдонаучным извращением, порожденным буржуазной идеологией».

С течением времени руководимый Николаем Васильевичем коллектив успешно завоевывал признание своих коллег в стране и за ее пределами. Публикация трудов Института, выступления Н.В. Турбина на генетических конгрессах и различного рода генетических форумах, активная позиция в вопросах использования достижений генетики для сельскохозяйственного производства способствовали высокой оценке руководством страны незаурядных организаторских способностей Николая Васильевича. В 1967 г. он избирается академиком Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук, а в 1968 г. - академиком-секретарем Отделения растениеводства и селекции - крупнейшего подразделения ВАСХНИЛ. В 1971 г. Николай Васильевич оставляет Институт генетики и цитологии в Минске и переезжает на работу в Москву. Его талант ученого организатора и активная научная деятельность явились предпосылкой значительного повышения теоретического уровня исследований, выполняемых в Институтах ВАСХНИЛ, в более эффективной организации прикладных исследований по растениеводству в СССР. В 1974 г. он создает в Москве Всесоюзный институт прикладной молекулярной биологии и генетики ВАСХНИЛ, которым руководит до 1980 г.

В последние годы своей жизни Николай Васильевич возглавлял лабораторию генетики и физиологии продуктивности

Всесоюзного (ныне Всероссийского) института растениеводства им. Н.И. Вавилова. Последним его научным увлечением стали исследования по генетике и селекции тритикале, которые он начинал в Беларуси, когда этой культуры еще в республике не знали. Все, к чему он прикасался, приобретало особое значение и масштабность. Работа по тритикале разворачивалась в разных районах СССР. Исследования проводились в России, Беларуси, Украине, Узбекистане, Киргизии и Таджикистане. Были созданы, испытаны и районированы в разных зонах Союза высокоурожайные сорта этой культуры, изучены особенности нового морфофизиологического типа гексаплоидного тритикале, отличающегося резко повышенной продуктивностью колоса, наиболее отзывчивого на интенсивную технологию выращивания, с потенциальной урожайностью при озимом посеве до 110-120 ц/га. Выведенный под руководством Н.В. Турбина и при его непосредственном участии в процессе селекции сорт ярового тритикале «Немига 2» был зарегистрирован Государственным агропромышленным комитетом СССР в 1982 г. и районирован в Киргизии и Таджикистане. После отъезда в Москву Николай Васильевич не прерывал связи с созданным им Институтом генетики и цитологии Академии наук Беларуси. Он был частым его гостем. В период отпуска, который Н.В. Турбин, как правило, проводил у себя на даче под Минском, мы организовывали деловые встречи в институте - обсуждали свои проблемы с Николаем Васильевичем, который оставался нашим учителем и большим другом. Несмотря на переезд в Москву, он сохранил членство в Белорусском обществе генетиков и селекционеров, участвовал в его работе, и был постоянным делегатом наших съездов. В 1997 году Н.В. Турбин принял участие в работе VII-ого съезда Общества генетиков и селекционеров Беларуси, который проходил в г. Горки Могилевской области в Белорусской сельскохозяйственной академии. Это был его последний визит в Беларусь. Летом

1998 г. Николай Васильевич ушел из жизни.

Как ученый, Н.В. Турбин всегда был преисполнен новыми идеями, рабочими гипотезами, он был неиссякаемым источником научных знаний. Людей близко знавших его поражала разносторонность его интересов. Николая Васильевича занимали вопросы самых разнообразных областей естествознания, он любил и хорошо знал философию, историю, русскую и зарубежную литературу, поэзию, искусство. С ним было очень интересно работать и общаться. Он привлекал своей безграничной любовью к науке. И нам, его ученикам и последователям, очень дороги слова, прозвучавшие в одной из последних публикаций («Неман», 1993, № 4), где он пишет: «Большое удовлетворение испытываю я также от создания и успешной деятельности Института генетики и цитологии НАН Беларуси, директором и организатором, которого я был, и в котором,

после переезда в Москву, оставил свое сердце.

Горжусь тем, что Институт, в составе которого работают многие мои ученики, стал важным центром генетических исследований и в наше трудное время сыграл ведущую роль в создании межгосударственной ассоциации генетических научных обществ стран СНГ – в благородном деле консолидации сил ученых-генетиков и селекционеров этих стран».

Нынешний IX съезд Белорусского общества генетиков и селекционеров проходит в год 95-летия со дня рождения академика Н.В. Турбина. Доброй памятью нашей о Николае Васильевиче будет развитие тех научных начинаний, идей и замыслов, в которые он вложил свою душу и вдохновителем которых был на протяжении всей своей жизни.

Дата поступления статьи 30 ноября 2007 г.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

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

Основой любой технологии производства в растениеводстве являются высокопродуктивные сорта растений, где на долю сорта отводится 40-50 %. Эффективная селекционная работа по созданию новых генотипов растений для нужд сельского хозяйства базируется на генетике как теоретической основе селекции. Традиционная селекция как наука, искусство и ремесло претерпевает серьезные изменения. К примеру, в растениеводстве это связано с сужением генетической изменчивости современных сортов, разнообразием почвенных, климатических и агротехнических условий возделывания, быстрыми изменениями в популяциях вредных организмов, необходимостью быстрой сортозамены и сортообновления, расширением спектра признаков, по которым производится отбор, необходимостью создания системы взаимодополняющих сортов по культуре и др.

Интенсификация селекции требует изменения приоритетов и разработки новых методических подходов на основе генетики и биотехнологии (Табл. 1). Генетические исследования за последние десятилетия в мире перешли на качественно новый уровень. В ряде лабораторий широко применяются молекулярные методы, построены генетические карты ряда хозяйственно-ценных организмов. Разработаны методы переноса генов от одного организма другому (трансгеноз), методы культивирования изолированных клеток, тканей и органов (клеточная инженерия) (Табл. 2). Таким образом, арсенал методов селекционеров растений, обогатился принципиально новыми подходами. Свой вклад в развитие этих подходов внес Институт ге-

нетики и цитологии НАН Беларуси. Арсенал генетико-биотехнологических методов, разработанных в ИГЦ, ориентирован на достижение основных приоритетов селекции.

1. Расширение спектра генетической изменчивости (мутагенез, рекомбиногенез, трансгеноз). Разработан метод создания нового типа ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум [1]. Метод основан на межродовой гибридизации тетраплоидной ржи ($RRRR$, $4x = 24$) с гексаплоидными тритикале ($AA BB RR$, $6x = 42$) (И.А. Гордей). Под руководством Н.А. Картеля разрабатываются технологии создания трансгенных растений методами агробактериальной и баллистической трансформации. Созданы трансгенные растения картофеля с геном хитиназы [2], которые будут тестироваться на устойчивость к грибным болезням в Институте картофелеводства НАН Беларуси (Рис. 1).

Впервые созданы трансгенные растения модельных объектов табака и арабидопсиса с генами, обеспечивающими толерантность к тяжелым металлам и способность разлагать углеводороды нефти [3]. Отрабатываются технологии создания трансгенных растений с этими генами на рапсе, ячмене, древесных породах.

В институте на основе классических и молекулярных методов генетики и биотехнологии созданы генетические коллекции пшеницы, тритикале, ржи, картофеля, томатов, перцев, сахарной свеклы, подсолнечника, сои. Для исследования генетической дивергенции между ними использовались методы RAPD – анализа, а также SSR – маркеры. К примеру, с помощью

молекулярных методов RAPD – PCR определен таксономический статус представителей рода *Linum* [4] и установлены филогенетические взаимоотношения между разновидностями льна культурного и их дикими сородичами (Л.В. Хотылева, В.А. Лемеш).

Использование SSR – маркеров для анализа генколлекций ряда культур (пшеница, лен, картофель, томат, соя, ячмень) дало возможность разработать ДНК – паспорта для сортов [5], обеспечивающие анализ уникальности, однородности и загрязненности сорта, степени его родства с другими сортами, присутствия аллелей хозяйственно-ценных генов (Н.А. Картель). Предложена схема исполь-

зования ДНК – паспортов для государственного контроля закупки семян отечественной (Рис. 2) и зарубежной селекции (А.В. Кильчевский, Н.А. Картель).

Использование молекулярных маркеров для анализа генетического разнообразия в генколлекциях становится необходимым элементом современного селекционного процесса.

Поиск и идентификация желаемых генов в исходном материале позволит более корректно подбирать родителей для гибридизации и контролировать селекционный процесс для получения сортов с заданными свойствами.

Таблица 1

Приоритеты современной селекции растений

| Приоритеты | Пути достижения |
|--|---|
| Расширение спектра генетической изменчивости | Мутагенез Рекомбиногенез Трансгенез |
| Повышение эффективности отбора | Селекция с помощью молекулярных маркеров Экологическая организация селекционного процесса |
| Повышение информативности селекционного процесса | Генетико-статистические методы в селекции Накопление оперативной информации для принятия решений |
| Сокращение сроков создания сортов и гибридов | Использование фитотронов Биотехнологические методы (гаплоидия, клональное микроразмножение ценных генотипов и др.) |

Таблица 2

Биотехнологические методы в селекции растений

| |
|---|
| Создание трансгенных организмов, несущих новые признаки. |
| Использование генетических маркеров для: |
| построения генетических карт; |
| создания идентифицированных генколлекций; |
| разработки технологий селекции с помощью маркеров. |
| Соматическая гибридизация для преодоления нескрещиваемости между видами. |
| Клеточная селекция. |
| Гаметная и зиготная селекция. |
| Получение гаплоидов и дигаплоидов для быстрой гомозиготизации материала и ускорения селекционного процесса. |
| Размножение уникальных генотипов в культуре <i>in vitro</i> . |
| Поддержание генетических коллекций <i>in vitro</i> , криосохранение. |

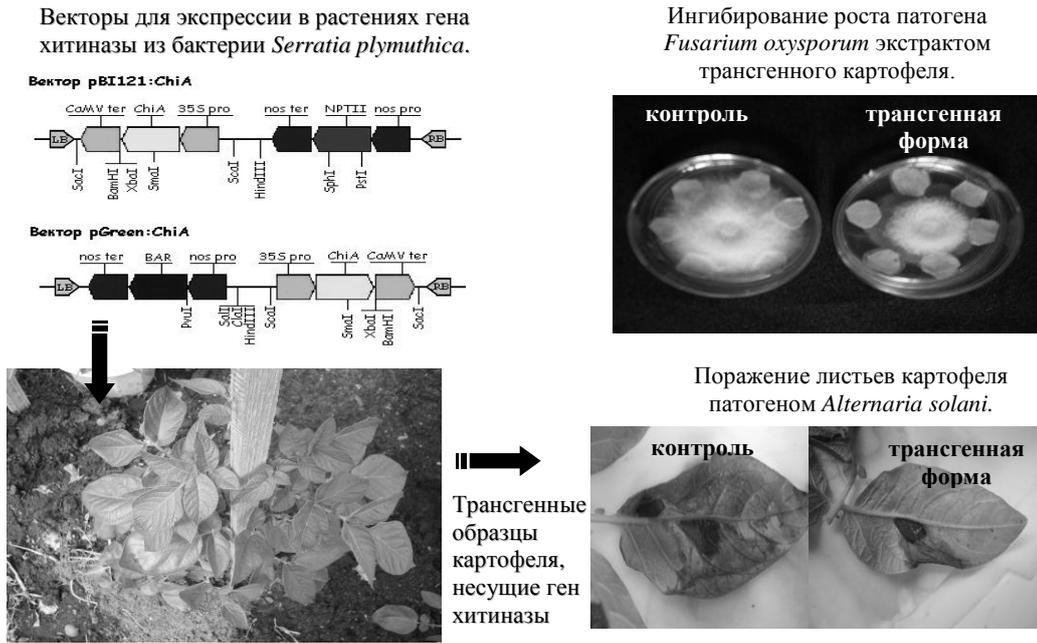


Рис. 1. Создание генетически модифицированных растений картофеля сорта Дельфин, содержащих ген хитиназы *chiA* из микроорганизма *Serratia plymuthica* (устойчивые к грибным патогенам)



Рис. 2. Предлагаемая схема государственного контроля закупки семян отечественной и зарубежной селекции.

2. Важным приоритетом селекции является повышение эффективности отбора. Здесь наиболее уместны два подхода: 1) точная идентификация желаемых генотипов на основе молекулярных и классических методов анализа; 2) экологическая организация селекционного процесса. В институте нашли широкое применение молекулярные маркеры для построения генетических карт, разработки технологий селекции с помощью маркеров. Создана генетическая карта ржи. Идентифицированы гены пшеницы, ответственные за устойчивость к бурой ржавчине и хлебопекарные качества. Выявлены ДНК-маркеры к генам, определяющим такие признаки пшеницы, как яровость и озимость, сроки созревания, прорастания в колосе, низкостебельность, хлебопекарные качества (Н.А. Картель). Подобраны ДНК – маркеры к генам устойчивости яблони к парше (О.Ю. Урбанович), картофеля к нематоде (А.П. Ермишин), кладоспориозу томата (В.А. Лемеш), лежкости томата (А.В. Кильчевский, С.В. Малышев), пивоваренного ячменя (О.Г. Давыденко). В рамках государственной программы «Биотехнология» будут разработаны методы маркер – сопутствующей селекции пшеницы, ржи, тритикале, сои, сахарной свеклы, картофеля, ячменя, капусты, яблони. Ускорение селекционного процесса благодаря применению отбора на основе ДНК – маркеров позволит сократить сроки создания сортов растений на 2 – 3 года, ускорить сортосмену, снизить затраты на их создание на 15 – 20 %. Разработаны принципиально новые методы определения качества льноволокна на основе термогравиметрического анализа, сканирующей электронной микроскопии [6], способствующие идентификации в ходе селекционного процесса генотипов-доноров высокого качества льнопродукции (Л.В. Хотылева, В.В. Титок). Уникальность методики заключается в возможности отбора индивидуальных генотипов по качеству волокна и содержанию биологически активных компонентов в семенах (Рис. 3).

Селекционный процесс – микроэволюция, направляемая человеком в конкретных условиях среды. Сочетание погодно-климатических условий каждого года уникально, длительность создания сорта обычно не менее 10 – 12 лет. В связи с этим эффективность селекции во многом зависит от средовых условий, в которых происходит отбор материала. А.В. Кильчевским, Л.В. Хотылевой разработаны принципы и методы экологической селекции растений для создания высокопродуктивных, энергоэффективных и экологически стабильных сортов, обеспечивающих получение экологически безопасной продукции [7]. Предложены схемы экологической организации селекционного процесса, модели сортов для различного энерговклада в технологию [8]. Выявлена существенная внутривидовая изменчивость (2–5 раз) по накоплению поллютантов (нитраты, тяжелые металлы, радионуклиды) в овощах. Показано, что селекция сортов с минимальным накоплением поллютантов является наиболее дешевым и эффективным способом получения экологически безопасной продукции, что особенно актуально для зон Беларуси, загрязненных радионуклидами и тяжелыми металлами [9].

3. Следующим приоритетом селекции является повышение информативности селекционного процесса в результате разработки и применения генетико-статистических методов, накопления оперативной информации для принятия решений. В Институте генетики и цитологии разработан пакет прикладных программ для генетиков и селекционеров РИШОН. В пакет входит более 30 программ по различным видам анализа экспериментальных данных. Использование генетико-статистических методов предполагает адекватное изменение схем селекционного процесса. Однако, только такой подход позволит многократно повысить научную составляющую селекции как технологии,

познать и усовершенствовать процесс селекции как эволюции, направляемой волей человека (Н.И. Вавилов). В лаборатории генетики фитоиммунитета проводится изучение эффективности известных и поиск новых генов резистентности пшеницы

к грибным болезням (бурой ржавчине, мучнистой росе и септориозу) с целью выявления эффективных доноров устойчивости для использования в селекционном процессе (Е.А. Волуевич, А.А. Булойчик).

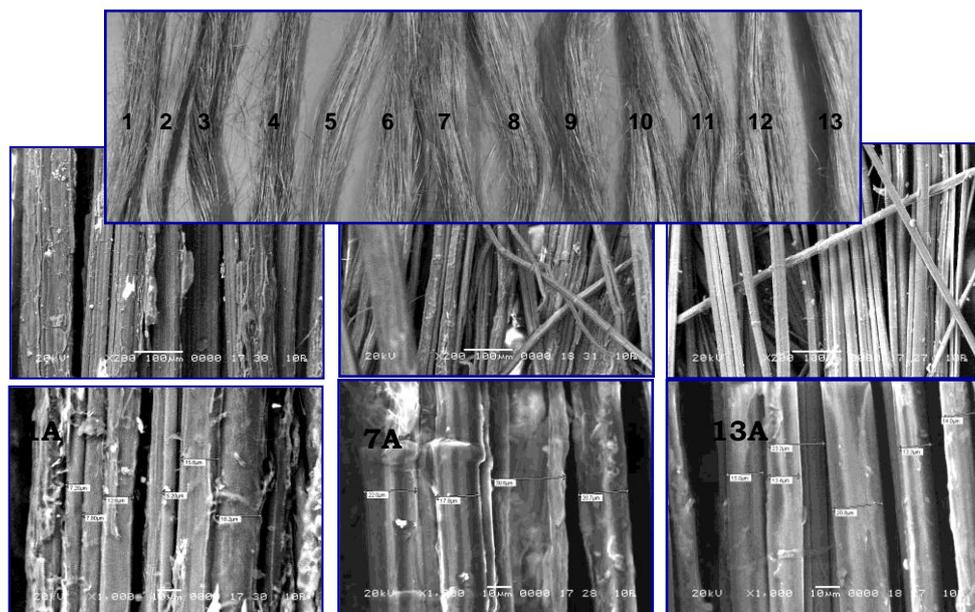


Рис. 3. Внешний вид и электронномикроскопические снимки льняного волокна сортообразцов № 1А, 7А и 13А.

Примечание: № 1А – низкое качество льноволокна, № 13А – высокое качество

На основе маркерных белков устойчивости к вирусам разрабатывается тест-система оценки селекционного материала картофеля на этот признак. Определена эффективность выявленных белков-маркеров устойчивости к вирусной инфекции у селекционного материала картофеля, включая сорта и гибридные сеянцы (А.Н. Палилова).

Совместно с РНИУП «ИЗиС НАНБ» выведен сорт мягкой яровой пшеницы Рассвет, который районирован с 2004 года на всей территории РБ как высокопродуктивный, устойчивый к болезням и обладающий высокими технологическими качествами.

4. Важным приоритетом селекции является сокращение сроков создания сортов и гибридов. Этой цели способствует использование фитотронов, получение 2 – 3

поколений в год, широкое применение биотехнологических методов. Наряду с применением генетической инженерии широкое использование находят методы клеточной инженерии (Табл. 2):

- соматическая гибридизация для преодоления нескрещиваемости между видами;
- клеточная, гаметная и зиготная селекция;
- получение гаплоидов и дигаплоидов для быстрой гомозиготизации материала и ускорения селекционного процесса;
- размножение уникальных генотипов в культуре *in vitro*;
- поддержание генетических коллекций *in vitro*, криосохранение.

В Институте генетики и цитологии отработаны методы получения гаплоидов

и дигаплоидов сахарной свеклы (А.М. Свирщевская), пшеницы (П.А. Орлов), тритикале и секалотритикум (И.А. Гордей), картофеля (А.П. Ермишин), что позволяет ускорить селекционный процесс по этим культурам на 3 – 4 года (Рис. 4). Получили развитие методы гаметной селекции (отбор по гаметофиту – пыльца) на устойчивость к абиотическим (пониженной температуре) и биотическим (фузариозу) факторам среды (А.В. Кильчевский, В.С. Анохина, И.Г. Пугачева). Гаметная селекция отличается сравнительной простотой и возможностью отбора среди миллионов генотипов на гаплоидном уровне [10]. Изучены генетические основы морфогенеза растений (П.А. Орлов), что позволяет отрабатывать технологии размножения уникальных, в том числе трансгенных генотипов *in vitro*.

Таким образом, современный арсенал генетических и биотехнологических методов в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси позволяет поднять на качественно новый уровень селекцию растений, повысить ее эффективность и уменьшить срок создания сортов и гибридов.

Сотрудники института принимают непосредственное участие в селекционном процессе по созданию сортов и гибридов растений в содружестве с коллегами из НИИ аграрного отделения и вузов (Табл. 3), а также компании Соя-Север, созданной при участии института. Результаты этой работы представлены в таблицах 4 и 5. За последние годы сотрудники ИГЦ приняли участие в создании 32 сортов растений, районированных в Беларуси. Проходят испытание в ГСИ Беларуси, России и Украины 22 сорта.

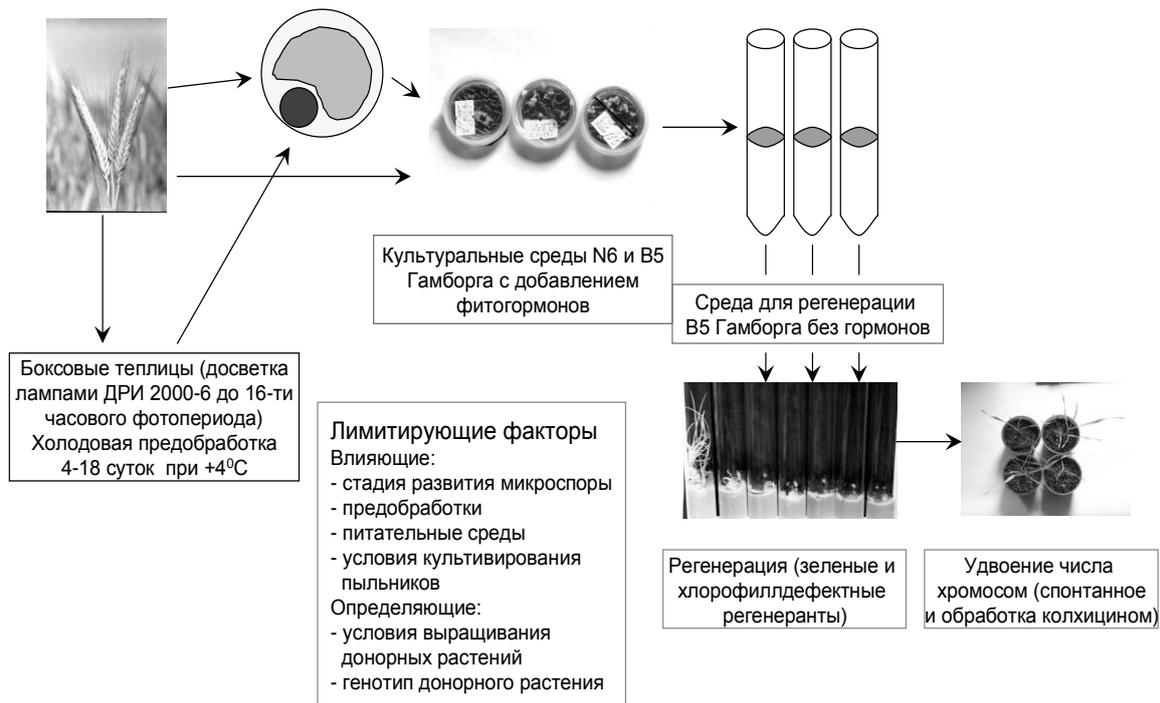


Рис. 4. Технология получения удвоенных гаплоидов тритикале и секалотритикум в культуре пыльников

Таблица 3
Селекция гетерозисных гибридов и сортов растений

| Культура | Учреждения | Авторы |
|----------------------------|----------------|--|
| Селекция гибридов | | |
| Томат для теплиц | ИГЦ, ИО | академик Л.В. Хотылева к.б.н. Л.А. Мишин |
| | ИГЦ, БГСХА | чл.-корр. А.В. Кильчевский к.с.-х.н. М.М. Добродькин |
| Томат для открытого грунта | ИГЦ, БГСХА | чл.-корр. А.В. Кильчевский к.с.-х.н. М.М. Добродькин |
| Подсолнечник | ИГЦ | чл.-корр. О.Г. Давыденко |
| Озимая рожь | ИГЦ, ИЗиС | д.б.н. И.А. Гордей к.с.-х.н. Р.П. Урбан |
| Сахарная свекла | ИГЦ, ОССС | к.б.н. А.М. Свищевская к.с.-х.н. И.С. Татур |
| Селекция сортов | | |
| Соя | Соя-Север, ИГЦ | чл.-корр. О.Г. Давыденко |
| Томат | ИГЦ, БГСХА | чл.-корр. А.В. Кильчевский к.с.-х.н. М.М. Добродькин |
| Перец | ИГЦ, ИО | академик Л.В. Хотылева к.б.н. Л.А. Мишин |
| Озимая рожь | ИЗиС, ИГЦ | к.с.-х.н. Р.П. Урбан д.б.н. И.А. Гордей |
| Яровая пшеница | ИЗиС, ИГЦ | академик С.И. Гриб д.б.н. Е.А. Волуевич |
| Лен | БНИИ льна, ИГЦ | к.с.-х.н. В.З. Богдан академик Л.В. Хотылева д.б.н. В.В. Титок |

Для ускоренного внедрения в Институте генетики и цитологии разработанных ДНК – биотехнологий в НАН Беларуси создан Национальный народное хозяйство республики в центр ДНК – биотехнологий (Рис. 5).



Рис. 5 Перспективные направления инновационной деятельности Центра ДНК – биотехнологий (серый цвет – имеющиеся области аккредитации, белый – планируемые).

Основными задачами центра являются разработка и внедрение современных биотехнологий, основанных на достижениях генетики и геномики, в практику сельского хозяйства, здравоохранения, охраны окружающей среды.

Имеющиеся научные заделы в генети-

ке и биотехнологии, современная материальная база, кадры, подготовленные в области молекулярной и прикладной генетики, позволяют в тесном сотрудничестве с учеными отделения аграрных наук и вузов повысить эффективность селекции новых сортов растений.

Таблица 4

Список районированных сортов растений, созданных при участии ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

| Культура | Сорт | Авторы | Год районирования |
|------------------------|--------------------------|----------------|-------------------|
| Томат | Зорка | БГСХА, ИГЦ | 2001 |
| | Гарант | БГСХА, ИГЦ | 2001 |
| | Польмя F ₁ | БГСХА, ИГЦ | 1998 |
| | Горецкий F ₁ | БГСХА, ИГЦ | 2004 |
| | Мазурка F ₁ | БГСХА, ИГЦ | 2004 |
| | Даша F ₁ | БГСХА, ИГЦ | 2005 |
| | Старт F ₁ | ИО, ИГЦ | 1997 |
| | Шторм F ₁ | ИО, ИГЦ | 2003 |
| | Евро F ₁ | ИО, ИГЦ | 2006 |
| | Александр F ₁ | БГСХА, ИГЦ | 2007 |
| Перец | Тройка | ИО, ИГЦ | 2001 |
| | Золотистый | ИО, ИГЦ | 2001 |
| | Ежик | ИО, ИГЦ | 2002 |
| | Алеся | ИО, ИГЦ | 2003 |
| | Кубик-К | ИО, ИГЦ | 2003 |
| Подсолнечник | Донской 962 | Соя-Север, ИГЦ | 2003 |
| | Фермер F ₁ | Соя-Север | 2007 |
| Озимая рожь | Спадчына | ИЗиС, ИГЦ | 2000 |
| | Завея-2 | ИЗиС, ИГЦ | 2001 |
| Яровая пшеница | Рассвет | ИЗиС, ИГЦ | 2004 |
| | Тома | ИЗиС, ИГЦ | 2007 |
| Сахарная свекла | Белдан | ОССС, ИГЦ | 1998 |
| | Кавебел | ОССС, ИГЦ | 1998 |
| | Данибел | ОССС, ИГЦ | 1999 |
| | Манеж (А9076) | ОССС, ИГЦ | 2003 |
| Соя | Вилия | Соя-Север, ИГЦ | 1995 |
| | Ясельда | Соя-Север | 1998 |
| | Ствига | Соя-Север | 2002 |
| | Березина | Соя-Север | 2004 |
| | Верас | Соя-Север | 2007 |
| | Припяць | Соя-Север | 2007 |
| | Рось | Соя-Север | 2007 |

Таблица 5

Список районированных сортов растений, созданных при участии ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» и переданных в Госсортоиспытание

| Культура | Сорт | Авторы | Год передачи в ГСИ |
|----------------|-----------------------------------|----------------|--------------------|
| Томат | Соната F ₁ | БГСХА, ИГЦ | 2004 |
| | Пионер F ₁ | БГСХА, ИГЦ | 2004 |
| | Белка F ₁ | ИО, ИГЦ | 2003 |
| | Белорусский лежкий F ₁ | БГСХА, ИГЦ | 2005 |
| | Адапт F ₁ | БГСХА, ИГЦ | 2006 |
| | Глянец | БГСХА, ИГЦ | 2008 |
| | Сторадж F ₁ | БГСХА, ИГЦ | 2008 |
| | Капля F ₁ | ИО, ИГЦ | 2006 |
| | Эллипс F ₁ | ИО, ИГЦ | 2006 |
| | Бум F ₁ | ИО, ИГЦ | 2007 |
| Перец | Тройка | ИО, ИГЦ | 2003 |
| | Золотистый | ИО, ИГЦ | 2003 |
| Яровая пшеница | Рассвет | ИЗиС, ИГЦ | 2007 |
| Секалотритикум | Вектор | ИЗиС, ИГЦ | 2002 |
| | Амулет | ИЗиС, ИГЦ | 2006 |
| Подсолнечник | Поиск F ₁ | Соя-Север, ИГЦ | 2005 |
| | Агат F ₁ | Соя-Север, ИГЦ | 2007 |
| Соя | Раница | Соя-Север | 2005 |
| | Рось | Соя-Север | 2005 |
| | СН 34-16 | Соя-Север | 2006 |
| | СН 62-19 | Соя-Север | 2007 |
| Озимая рожь | Плиса F ₁ | ИЗиС, ИГЦ | 2007 |

Список использованных источников

1. Люсиков О.М., Белько Н.Б., Щетько И.С., Гордей И.А. Создание ржано – пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум (RRAABB, 2n=42): Специфичность мейоза у ржано – тритикальных гибридов F₁ (RRABR, 5x=35) // Генетика, 2005, Т. 41, № 7, С. 902 – 909.

2. Шахбазов А.В., Картель Н.А. Инактивация гена бактериальной эндохитиназы в трансгенном тетраплоидном картофеле *Solanum tuberosum* L. Сб. Молекулярная и прикладная генетика. Минск. 2006. Т. 3. С. 165 – 169.

3. Brichkova G., Kartel N., Sorokin A. Bioremediation with ecologically safe plants genomics for biosafety in plant biotechnology. Nato Sciences series 2004, V. 359, P. 147 – 158.

4. Лемеш, В.А., Шут М.В., Хотылева Л.В. RAPD – Анализ межвидового полиморфизма льна (род *Linum*) // Вестник ВОГИС, 2005, Т. 9, N. 4, С. 490 – 494.

5. Мальшев С.В., Урбанович О.Ю.,

Картель Н.А. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК – маркеров. Методические рекомендации. Минск, 2006, 27 С.

6. Titok V., Leontiev V., Shostak L., Khotyleva L. Thermo gravimetric analysis of the flax bastfibre bundle // Journal of Natural Fibers. – 2006. Vol. 3.N1 – P. 35 – 41.

7. Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Экологическая селекция растений. – Мн: Тэхналогія, 1997. – 372 С.

8. Кильчевский А.В. Генетико – экологические основы селекции растений. Вестник ВОГИС, 2005, Т. 9, № 4, С. 518 – 526.

9. Kilchevsky A., Kogotko L., Shchur A., Kruk A. Genetic Aspects of Pollutant Accumulation in plants // Multiple Stressors: A challenge for the Future. Springer, Minsk, 2006, P. 225 – 234.

10. Картель Н.А., Кильчевский А.В. Биотехнология в растениеводстве. – Мн. Тэхналогія, 2005. – 310 С.

Дата поступления статьи 29 ноября 2007 г.

ГЕНОМИКА МИКРОТРУБОЧЕК КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, г. Киев
Украина, 03143, г. Киев, ул. Заболотного, 148

ВВЕДЕНИЕ

Микротрубочки – филаментные структуры, которые являются облигатным компонентом всех без исключения эукариотических клеток. Они обеспечивают поддержку формы клетки [1], структурную организацию цитоплазматического пространства и внутриклеточный транспорт [2-6], регуляцию клеточного цикла и расхождение хромосом во время клеточного деления [7-9], рост, дифференциацию, морфогенез и регенерацию клеток [10-15], а также жгутиковую и иные формы клеточной подвижности [16-18].

Основным структурным компонентом микротрубочек являются тубулины, состоящие из двух гомологичных субъединиц – α и β [19]. Надсемейство тубулинов – эукариотические глобулярные белки молекулярной массой 50-55 кДа, которые характеризуются высоким уровнем консервативности аминокислотных последовательностей [20-22]. Кроме упомянутых α - и β -тубулинов, к этому надсемейству принадлежат γ -тубулин – основной структурный компонент центров организации микротрубочек (ЦОМТ), а также ряд minorных тубулинов, также ассоциированных с ЦОМТами различных организмов на разных стадиях клеточного цикла, функции которых до конца не ясны [23]. Помимо тубулинов, в состав микротрубочек входят БАМы (белки, ассоциированные с микротрубочками), которые в свою очередь подразделяются на структурные [24, 25] и моторные (динеин, кинезин) [26, 27].

Типичная цитоплазматическая микротрубочка представляет собой полый цилиндр, состоящий из 13 протофиламентов (у некоторых специализированных микро-

трубочек число протофиламентов может варьировать) [20, 25, 28]. Каждый протофиламент формируется путём ассоциации гетеродимеров, состоящих из α - и β -субъединиц тубулина, которые взаимодействуют между собой по типу «голова-хвост». Протофиламенты в микротрубочках ориентированы параллельно с небольшим сдвигом (около 10°C) относительно поперечного сечения микротрубочки. Вследствие этого гетеродимеры тубулины в трубочке описывают спираль с небольшим шагом, зависящим от количества протофиламентов. Каждый гетеродимер касается двух соседних протофиламентов, образуя так называемые латеральные контакты (в отличие от продольных контактов, которые формируются в результате ассоциации мономеров между собой и последующим формированием протофиламента) [28].

Микротрубочки характеризуются разной степенью стабильности в зависимости от типа структур, которые образованы микротрубочками, типа клеток и тканей и стадии их развития. Разница в функциональном состоянии систем микротрубочек обеспечивается так называемой микрогетерогенностью популяции тубулинов [23, 29]. Эта микрогетерогенность реализуется двумя путями. Первый путь – мультигенность и соответствующая дифференциальная экспрессия нескольких изоформ тубулинов, что особенно характерно для тубулинов животных и растений [23, 30, 31], второй – многочисленные посттрансляционные модификации, которым подвергаются тубулины [32, 33].

Фундаментальное свойство молекул тубулинов специфическим образом связы-

вать низкомолекулярные соединения разной природы делает микротрубочки своеобразным «узким местом» в ответе эукариотической клетки на воздействие химических факторов [34-36]. Как следствие такого высокоспецифичного взаимодействия с тубулином происходит либо разрушение, либо необратимая стабилизация микротрубочек [36]. Поскольку именно α - или β -субъединицы тубулина являются мишенями для широкого спектра коммерчески значимых препаратов, которые используются в качестве фунгицидов, гербицидов, противоопухолевых, антипротозойных и противогельминтных средств, изучение геномных основ чувствительности/устойчивости к этим соединениям имеет не только теоретический, но и весомый практический аспект. В частности, значительное развитие получили исследования по изолированию мутантных генов тубулинов для установления тех изменений в их последовательностях, которые могут определять устойчивость микротрубочек к этим соединениям, (поскольку в общем случае устойчивость к антимикутробочковым соединениям вызывается точечными мутациями в молекулах тубулинов) [37-39].

Несмотря на высокий уровень консервативности аминокислотных последовательностей тубулинов, изолированных из различных организмов, тубулины грибов, животных и растений четко различимы по некоторым фармакологическим и иммунологическим свойствам [20, 40] и аминокислотным последовательностям [41]. Вследствие этого ряд веществ, специфически связывающихся с тубулином и, таким образом, нарушающих функциимикротрубочек, характеризуются различным сродством к тубулинам грибов, животных и растений, что позволяет исследователям использовать их в качестве важнейшего инструмента для изучения структуры и функций как микротрубочек в целом, так и тубулина в частности [35, 38, 42]. Особенно интересными в этом аспекте являются соединения динитроанилинового и фос-

фороамидного рядов, которые используются в качестве высокоэффективных гербицидов [43-46]. Уникальность взаимодействия этих соединений с молекулами тубулина заключается в его чрезвычайно высокой специфичности – эти вещества эффективно связываются с тубулинами растительного (а также протозойного) происхождения и практически не взаимодействуют с тубулинами животных и грибов, несмотря на чрезвычайно высокий уровень сходства их последовательностей [47-50]. Прочие классы химических соединений, обладающих сродством к молекулам тубулина, способны связываться с этими белками вне зависимости от происхождения последних. Следует также отметить, что к антимикутробочковым соединениям принадлежит приблизительно четверть всех используемых на рынке гербицидов [45, 46]. Кроме упомянутых динитроанилинов и фосфороамидов, к ним относятся фенилкарбаматные препараты [34, 51], гербициды пиримидиновой природы [52] и цианоакрилаты [53]. Последние, как было установлено недавно, также являются специфическими эффекторами тубулина растений, подобно динитроанилинам и фосфороамамидам.

Любая мутация в гене, которая проявляется в виде изменения фенотипа, даёт ответ о функциональном значении данного гена и его роли для нормального функционирования клетки и организма в целом. Таким образом, мутантные линии растений (как естественные, так и полученные искусственно путём соответствующих селективных процедур), обладающие повышенной устойчивостью к антимикутробочковым соединениям, являются весьма привлекательным объектом для применения к ним современного инструментария функциональной и структурной геномики.

Анализ геномных механизмов устойчивости растений к антимикутробочковым соединениям. Среди растений, для которых обнаружены биотипы с природной устойчивостью, молекулярные механизмы устойчивости к гербицидам с

антимикротрубочковой активностью наиболее детально изучались на примере динитроанилин-устойчивых биотипов *Eleusine indica* (L.) Gaerth. (гусиная трава индийская) и *Setaria viridis* (L.) Beauv. (щетинник зелёный, мышей зелёный) [39, 46, 51]. В обоих случаях была обнаружена перекрестная устойчивость этих биотипов к некоторым другим структурно несходным гербицидам, нарушающим митоз. Оказалось, что резистентный биотип *E. indica* перекрестно устойчив не только ко всем динитроанилинам, но и к фосфоротиоамидному гербициду, амипрофосметилу (АПМ; *N*-изопропил *O*-(2-нитро-*p*-толил) фосфорамидотиоат) [54, 55]. Однако и резистентный, и чувствительный биотипы *E. indica* обладали одинаковой чувствительностью к таким антимикротрубочковым гербицидам, как пронамид (3,5-дихлоро- (*N*-1,1 – диметил - 2 пропинил) - бензамид), тербутол (карбаматный гербицид) и ДХФК (диметиловый эфир 2,3,5,6-тетрахлор-терефталевой кислоты) [55]. В то же время динитроанилин-устойчивый биотип *S. viridis* оказался в равной степени устойчивым и к АПМ, и к ДХФК, и к тербутолу [56]. Так же, как и устойчивый биотип *E. indica*, устойчивый биотип *S. viridis* демонстрировал перекрестную резистентность к антимикротрубочковому гербициду дитиопиру (*S,S*-диметил - 2 - (дифлуорометил) - 4 - (2 метилпропил) - 6 - трифлуорометил) - 3,5 пиридин дикарботиоат) [56]. Рядом исследователей было показано, что устойчивость к динитроанилинам у *E. indica* является результатом единичной нуклеотидной замены (точечной мутации) в последовательности гена $\alpha 1$ -тубулина, приводящей к замене треонина в позиции 239 на изолейцин аминокислотной последовательности $\alpha 1$ -тубулина [57-59]. Поскольку для многих эукариот и, в частности, для растений наличие треонина-239 в последовательности α -тубулина является весьма консервативным, авторы предположили, что замена этого остатка на изолейцин в последовательности α -тубулина, равно как и аналогичные замены

Тре-237 в молекуле β -тубулина и Тре-240 в молекуле γ -тубулина, может приводить к появлению видоизмененного тубулина, определяющего повышенную устойчивость к динитроанилиновым гербицидам [57].

Аналогичные результаты молекулярно-генетического анализа устойчивых и чувствительных к динитроанилинам биотипов *E. indica* были получены другой группой исследователей [60-63]. При изучении трех изоформ кДНК α -тубулина (*TUA1*, *TUA2* и *TUA3*), изолированных из высокоустойчивого R-биотипа, чувствительного S-биотипов, а также обладающего промежуточным уровнем устойчивости I-биотипа *E. indica*, нуклеотидные отличия между чувствительными и устойчивыми α -тубулинами были найдены у *TUA1* и *TUA2* [62]. Наиболее значительными различиями в R- и I-биотипах являлись обнаруженные в *TUA1* миссенс-мутации, приводящие к замене треонина-239 на изолейцин в R-биотипе, а в I-биотипе – к замене метионина-268 на треонин [62].

В случае с *S. viridis* при анализе последовательностей тубулинов из устойчивой и чувствительной к динитроанилинам линий были обнаружены две аминокислотные замены в гене $\alpha 2$ -тубулина, определяющие устойчивость к этим веществам: лейцин-136 был замещен на фенилаланин, а треонин-239 – на изолейцин [64]. Обе мутации обеспечивали перекрестную устойчивость к различным представителям динитроанилинов без изменений чувствительности к бензимидазолам и гиперчувствительности к карбаматам.

Мутация, приводящая к замене аргинин-241 на лизин, была идентифицирована в гене β -тубулина у динитроанилин-устойчивых растений *Poa annua* L. (мятлик однолетний) [65]. Ещё одна замена в гене β -тубулина (лизин-350 на метионин) также имеющая следствием повышенную устойчивость к динитроанилинам, была идентифицирована у низшего растения - зелёной водоросли хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii* Dang.) [66, 67].

Наряду с геномными исследованиями растений с природной устойчивостью к антимикротрубочковым (антитубулиновым соединениям), широкое распространение получили исследования, связанные с селекцией *in vitro* устойчивых линий и их последующим анализом. Так, в результате прямой клеточной селекции с предварительным использованием гамма-облучения в качестве индуктора мутагенеза нами впервые были получены мутантные линии *Nicotiana plumbaginifolia* Viv., устойчивые к АПМ [68–70] и трифлуралину (динитроанилиновый гербицид) [71–73]. Уровень устойчивости к АПМ у АПМ-устойчивой линии в 10 раз превышал аналогичный показатель у исходной линии, а уровень устойчивости к трифлуралину у трифлуралин-устойчивой линии – в 7 раз. Было установлено, что признаки устойчивости к АПМ и трифлуралину наследуются в поколениях F1 и F2 мутантов, при этом у АПМ-устойчивой линии резистентность наследовалась как доминантный гомозиготный ядерный признак [70], а у трифлуралин-устойчивой линии – как семидоминантный гетерозиготный признак [71]. Полученные АПМ-резистентные мутанты обладали также перекрестной устойчивостью к трифлуралину, а трифлуралин-резистентные мутанты, соответственно, обладали перекрестной устойчивостью к ампифосметилу. При этом отмечалась стабильная экспрессия полученных признаков устойчивости к этим гербицидам.

Поскольку ранее предполагалось, что оба гербицида имеют подобные сайты связывания на молекуле тубулина [55, 74–76], был проведен двумерный электрофорез тубулина из обеих линий мутантов с последующим иммуноблотингом. Оказалось, что как и в АПМ-, так и в трифлуралин-устойчивых растениях присутствует измененная изоформа β -тубулина. Было установлено также, что тубулин, изолированный из АПМ устойчивых растений, имеет резко сниженное сродство к АПМ [77]. Это позволило предположить, что наличие измененных изоформ β -тубулина у полу-

ченных линий растений *N. plumbaginifolia* может быть следствием мутаций в соответствующих генах. Поэтому полученные мутанты *N. plumbaginifolia*, устойчивые к АПМ, были использованы для изолирования и секвенирования гена β -тубулина, который обеспечивает устойчивость к этому гербициду. Было показано, что искомая мутация является результатом замещения остатка серина на остаток пролина в положении 248 в одном из генов β -тубулина, изолированных из мутантной линии *N. plumbaginifolia* [78].

Структурная геномика устойчивости растений к антимикротрубочковым веществам. В наших последующих работах была продемонстрирована связь между особенностями изменений в последовательностях мутантных тубулинов растительного происхождения (продуктов как мутантных генов α -тубулина из динитроанилин-устойчивых линий *Eleusine indica*, так и секвенированного нами гена β -тубулина из АПМ-устойчивой линии *N. plumbaginifolia*) и характером пространственного взаимодействия их молекул с антимикротрубочковыми гербицидами. Эти результаты были получены с помощью методов структурной геномики: моделирования пространственной структуры тубулинов высших растений и идентификации потенциальных сайтов взаимодействия α - и β -тубулина с динитроанилинами и фосфоротиоамидами. Поскольку известно, что остаток треонин-239 очень консервативен для всех известных α -тубулинов грибов, растений и животных, анализ последовательностей, фланкирующих сайт мутации, показал, что они тоже достаточно консервативны, хотя и не идентичны у всех изученных последовательностей α -тубулина растений.

Для детального анализа механизмов специфического взаимодействия динитроанилинов с тубулином нами были реконструированы трехмерные структуры молекул α -тубулина из различных биотипов *E. indica*, включая распределение электростатического потенциала на их поверхности с

одновременной локализацией сайта связывания динитроанилинов [54, 79].

Принимая во внимание тот факт, что как чувствительность, так устойчивость растений к гербицидам динитроанилинового ряда всегда сопряжена с положительно-перекрестной чувствительностью / устойчивостью к гербицидам фосфоамида природы, удалось установить предполагаемую группу, детерминирующую опознавание / связывание этих гербицидов с тубулином: все динитроанилины, равно как и фосфоамиды, используемые в качестве гербицидов, имеют в своём составе бензольное кольцо с присоединённой нитрильной группой. Ориентация нитрильной группы относительно плоскости бензольного кольца у фосфоамидных соединений практически совпадает с таковой у динитроанилинов. Величины электрического заряда на атомах, которые образуют детерминантную группу, являются постоянными показателями и не зависят от состава и пространственной геометрии других групп, которые входят в состав исследуемых молекул гербицидов. Соответственно, распределение электростатического потенциала для группы-детерминанта молекул гербицидов закономерно имеет идентичный характер – отрицательно заряженные кислородные атомы создают ярко выраженную область негативного потенциала на нитрогруппе.

Выявление нами функциональной группы молекул динитроанилинов / фосфоамидов, которая фактически обеспечивает процесс взаимодействия этих соединений с молекулой тубулина, дало возможность определиться, участок с какими свойствами нужно искать на молекулярной поверхности α -тубулина гусиной травы. Во-первых, вследствие выраженного негативного потенциала на NO_2 -группе, наиболее достоверным локусом взаимодействия для нее на поверхности молекулы белка должна являться положительно заряженная полость. Во-вторых, поскольку динитроанилины являются веществами с деполимеризующим механизмом дейст-

вия, искомая полость либо содержит в своём составе аминокислотные остатки, принимающие участие в формировании поверхностей продольных контактов между α - и β -субъединицами тубулина, либо непосредственно прилегает к таковым.

В-третьих, сайт связывания динитроанилиновых соединений должен локализоваться по возможности близко к сайтам мутаций, которые обуславливают возникновение устойчивости к этим веществам. Конечно, нельзя исключать и эффектов дистальных мутаций, особенно учитывая способность точечных мутаций влиять на структуру тубулина в целом [79, 80], но гипотеза пространственной близости интерактивных сайтов и позиций соответствующих мутаций представляется более достоверной. Вполне вероятно, что в образование искомого сайта связывания вовлечены остатки основных аминокислот – лизина, аргинина или гистидина, поскольку именно эти остатки могут обеспечить наличие необходимого положительного заряда молекулярной поверхности тубулина.

Анализ структуры молекулярной поверхности α -тубулина *Eleusine indica* и распределения на ней электростатического потенциала позволил установить, что всем перечисленным условиям отвечает лишь одна молекулярная полость, образованная аминокислотными остатками Arg2, Arg243, Val250, Asp251, Val252, Asn253, Glu254 (а также частично Cys4, His8, Leu136 и Phe138). Докинг в потенциальный сайт взаимодействия представителей динитроанилинов и фосфоамидов осуществлялся таким образом, чтобы NO_2 -группа отмеченных соединений располагалась в обнаруженной положительно заряженной полости. При этом ближайшими к нитрогруппе являются остатки Arg2, Asp251 и Asn253. Дополнительная аминокислотная группа аргинина в положении 2 экспонирована на поверхности молекулы и ориентирована в сторону потенциальной области взаимодействия, внося таким образом непосредственный вклад в формирование позитивного потенциала обнаруженной

полости. Кислотная группа аспартата в положении 251, напротив, погружена в толщу молекулы и ориентирована в сторону, противоположную потенциальной области взаимодействия, не влияя, таким образом на свойство последней.

Анализ пространственной структуры образованных комплексов растительного α -тубулина с динитроанилиновыми соединениями показал, что кроме 7 названных выше остатков, во взаимодействие с лигандами вовлечены также остатки Gln133, Asn249 и Gly256. Вполне закономерно, что в результате связывания α -тубулином молекулы динитроанилина в районе обнаруженного сайта последующая полимеризация микротрубочки оказывается невозможной, поскольку гербицид становится непосредственным препятствием для нормального узнавания и связывания β -тубулина следующего димера. Кроме того, ряд остатков, которые образуют сайт взаимодействия, в частности Gln133, Asn249, Asp251 и Gly256, принимают участие во взаимодействии с молекулой гуанозинтрифосфата – обязательного фактора полимеризации тубулинов присоединённого к последующему димеру.

Важность остатка аргинина в позиции 2 не ограничивается его вкладом в повышение позитивного потенциала локуса взаимодействия. Особая роль этой аминокислоты заключается в дополнительной стабилизации образованных комплексов в результате взаимодействия ее аминокислотной группы с группами-заместителями динитроанилиновым и фосфоамидными соединениями, которые являются индивидуальными для каждого вещества и несут частичный отрицательный заряд. Группы-заместители выступают в роли модификаторов процесса взаимодействия. Свойства этих групп определяют различия в стабильности образуемых комплексов тубулина с различными представителями динитроанилинов/фосфоамидов, что на физиологическом уровне имеет следствием разную эффективность конкретных гербицидов.

Аминокислотный остаток треонина в позиции 239, замена которого на изолейцин приводит к возникновению устойчивости к гербицидам динитроанилинового и фосфоамидного ряда, не экспонирован на поверхности молекулы растительного α -тубулина. Впрочем, это является достаточно характерным для расположения мутаций, обуславливающих повышенную устойчивость к антитубулиновым веществам с деполимеризующим механизмом действия [81]. Но следует отметить, что, хотя треонин-239 и не принимает непосредственного участия в связывании молекулы гербицида, он располагается прямо под обнаруженной полостью взаимодействия. При такой пространственной локализации остатка замена в этой позиции может непосредственно влиять на пространственную структуру сайта взаимодействия.

Анализ молекулярной поверхности α -тубулина R-биотипа гусиной травы, который был применен для сравнения свойств соответствующих областей чувствительного и устойчивого изоформ α -тубулина, показал, что замена треонина на изолейцин действительно является стерически эффективной и вызывает пространственную переориентацию боковых цепей соседствующих на поверхности молекулы и вблизи нее аминокислотных остатков, в результате чего обнаруженная полость взаимодействия закрывается, а интеграция действующей группы гербицидов в эту область на поверхности белка становится невозможной. Одновременно происходят значительные конформационные изменения в обнаруженном сайте связывания динитроанилинов с молекулой α -тубулина. Нами показано, что замена треонина-239, находящегося в районе седьмой спирали, может влиять на трехмерную структуру молекулы α -тубулина в целом [79]. Таким образом, полученные результаты хорошо согласовываются с экспериментальными данными относительно влияния точечной замены в положении 239 молекулы α -тубулина на уровень устойчивости / чув-

ствительности к динитроанилинам [59, 62].

В случае замены метионина-268 на треонин (α -тубулин I-биотипа), в сайте взаимодействия наблюдается несколько иная картина. Эта замена вызывает не полное, а лишь частичное закрытие положительно заряженной полости. Такая перестройка молекулярной поверхности в области сайта связывания имеет своим следствием то, что способность к образованию комплексов между гербицидом и белком частично сохраняется.

В то же самое время наши результаты по реконструкции трехмерной структуры молекул β - и γ -тубулинов свидетельствуют о том, что наличие остатков треонина в положениях 237 или 240, соответственно, не является фактором, определяющим формирование полости взаимодействия с изучаемыми гербицидами (иными словами, эта полость отсутствует в обоих случаях) [82]. Замена же остатка треонина в этих положениях на остаток изолейцина не приводит к заметной реорганизации поверхности молекул как β -, так и γ -тубулинов, т.е. не влечет за собой никаких функциональных последствий. Следовательно, развитие устойчивости молекулы тубулина к динитроанилинам определяется не только положением и природой заменяемого аминокислотного остатка, но и его пространственным микроокружением, формируемым соседствующими аминокислотными остатками. Таким образом, ранее сформулированный постулат о том, что замены Тре-237 в молекуле β -тубулина и Тре-240 в молекуле γ -тубулина должны приводить к появлению видоизмененного тубулина, определяющего повышенную устойчивость к динитроанилиновым гербицидам [57], опровергается результатами пространственного моделирования.

Полученные нами результаты по анализу особенностей пространственных структур молекул α -тубулинов S-, I- и R-биотипов *E.indica* позже были подтверждены независимыми исследованиями по реконструкции сайта взаимодействия с

динитроанилинами молекулы α -тубулина из *S.viridis*. Как уже отмечалось, у этого растения были обнаружены 2 мутации, вызывающие повышенную устойчивость к динитроанилинам: замена треонина на изолейцин в позиции 239, аналогичная мутации у гусиной травы, а также замена лейцина на фенилаланин в позиции 136 [64], которая входит в состав предсказанной нами ранее области взаимодействия. Авторами этой работы было также показано, что сайт связывания динитроанилинов расположен практически в зоне контакта между димерами тубулина, что совпадает с нашими данными.

Однако авторы исследований, посвященных интерактивным свойствам молекул α -тубулинов простейших *Toxo-plasma gondii* и *Leishmania major*, полагают, что хотя сайты взаимодействия, предсказанные для α -тубулина высших растений и простейших частично перекрываются, связывание динитроанилиновых гербицидов нарушает латеральные контакты между протофиламентами микротрубочек [83, 84]. Однако последние результаты по ряду причин представляются несколько сомнительными. Во-первых, такое расположение сайта выпадает из общей закономерности расположения сайтов связывания деполимеризующих микротрубочки веществ. Во-вторых, докинг динитроанилинов в потенциальный сайт взаимодействия произведён без учёта того, что всем динитроанилинам присущ общий структурный компонент, подробно рассмотренный нами выше, в результате чего оризалин оказался пристыкованным к α -тубулину с помощью сульфоксильной группы. И, наконец, в третьих, несмотря на то, что программное обеспечение AutoDock [85], использованное авторами этой для автоматического поиска сайта взаимодействия, является распространённым и широко цитируемым в научной литературе (172 ссылке в PubMed), его, согласно нашим данным, оказалось невозможно откалибровать на комплексах тубулина с низкомолекулярными веществами, структура которых была установлена

по данным кристаллографии (иными словами, не удалось подобрать параметры, при которых программа воспроизводила бы комплексы с известной пространственной структурой и локализацией сайтов взаимодействия). В то же время наши результаты по реконструкции пространственной структуры α -тубулинов малярийного плазмодия *Plasmodium falciparum* показали, что в области, которая отвечает интерактивному сайту на поверхности молекулы α -тубулина *E.indica*, находится положительно заряженная полость, которая может служить местом связывания нитрогруппы динитроанилинов, подобно соответствующей области на поверхности α -тубулина гусиной травы. Структуры „карманов” на поверхности сравниваемых α -тубулинов несколько отличаются между собой, что закономерно определяется отличиями в аминокислотном составе исследуемых белков (в частности, в составе интерактивного сайта, который приведен в табл. 3, вместо аспарагина в положении 253 содержится остаток треонина, что может приводить к образованию дополнительной водородной связи) [86]. В то же время в этой области α -тубулинов животных (*Sus scrofa*) и грибов (*Mycosphaerella graminicola*) подобные полости отсутствуют, что свидетельствует об отсутствии соответствующих сайтов связывания на поверхности этих белков. Таким образом, можно с высокой степенью достоверности допустить, что сайты связывания исследуемых низкомолекулярных соединений на поверхности α -тубулинов растений и простейших все-таки совпадают между собой.

С целью идентификации сайтов связывания динитроанилинов на поверхности β -субъединиц тубулина нами были реконструированы пространственные структуры молекул β -тубулина *Chlamydomonas reinhardtii* и *Nicotiana plumbaginifolia*, различающихся по степени сродства к динитроанилиновым соединениям [78]. Анализ особенностей пространственной структуры и распределения электростатического

потенциала на их поверхности показал, что состав и локализация « β -сайтов» связывания динитроанилинов характеризуется определенными отличиями относительно соответствующих сайтов на поверхности α -тубулинов. Сайты располагаются на интрадимерной поверхности, содержат по 2 диаминовых аминокислотных остатка, причем остаток лизина-350, в результате мутации по которому происходит повышение устойчивости к динитроанилинам у хламидомонады, и остаток серина-248, вызывающий аналогичный эффект у табака, непосредственно входят в состав соответствующего интерактивного сайта и микроокружения связанной нитрогруппы (в составе соответствующих комплексов). Замена лизина-248 на остаток метионина и серина-248 на остаток пролина, практически, блокирует полости, принимающие участие в связывании молекул гербицидов. Таким образом, стерические эффекты этих подобны таковым, наблюдающимся вследствие замены треонина-239 на илейцин в α -субъединице тубулина. Таким образом, мы можем заключить, что связывание динитроанилиновых соединений α - и β субъединицами тубулина осуществляется по общим закономерностям и структурным механизмам, хотя и с различием в локализации и составе интерактивных сайтов.

Использование мутантных генов тубулинов в биотехнологии растений. Вполне закономерно, что мутантные гены тубулинов растений, обеспечивающие устойчивость к антимикротрубочковым соединениям, нашли своё применение в биотехнологии. В середине 90-х годов прошлого столетия нами были осуществлены первые эксперименты по переносу мутантных генов β -тубулина, обуславливающих устойчивость к динитроанилинам и фосфороамидам, в от ранее полученных линий *N. plumbaginifolia* в близкородственные и отдаленные виды были сопряжены с использованием методов симметричной и асимметричной соматической гибридизации [87-91]. Признак устойчивости к АПМ или трифлуралину переносили

в реципиентные растения *N.sylvestris* и *Atropa belladonna*. В результате слияния и селекции в присутствии АПМ или трифлуралина нами были получены серии межвидовых и межтрибных гибридов *N. plumbaginifolia*+*N. sylvestris* и *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* с повышенной устойчивостью к АПМ или трифлуралину, соответственно. Данные цитогенетического анализа и результаты наследования признака устойчивости в первом поколении полученных фертильных соматических гибридов свидетельствовали о том, что их устойчивость к АПМ и трифлуралину является прямым следствием переноса генетического материала от соответствующих мутантов *N. plumbaginifolia* [87-91].

Как и в случае иммунофлюоресцентного анализа микротрубочек исходных мутантов *N. plumbaginifolia* [69-71], было обнаружено, что кортикальные и митотические микротрубочки протопластов гибридных растений не разрушаются при обработке АПМ [87, 88, 90, 91] или трифлуралином [89] в селективных концентрациях, в то время как микротрубочки в протопластах родительских линий *N. sylvestris* и *A. belladonna* полностью деполимеризовались под действием указанных веществ. Результаты двумерного электрофореза тубулина гибридных и родительских растений с последующим иммуноблоттингом подтвердили экспрессию в гибридах *N. plumbaginifolia*+*N. sylvestris* и *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* наряду с изоформами α - и β -тубулинов реципиента дополнительной изоформы β -тубулина, характерной для мутантов *N. plumbaginifolia* [87, 89-91].

С учетом того, что селекция соматических гибридов осуществлялась на средах, содержащих АПМ или трифлуралин, нами впервые была продемонстрирована принципиальная возможность эффективного использования признака устойчивости к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия, сопряженного с наличием мутантного тубулина, в качестве маркерного признака.

Принимая во внимание высокий селективный потенциал динитроанилинов и фосфороамидов, а также успешные результаты по использованию признака устойчивости к этим гербицидам в качестве маркерного при получении соматических гибридов растений, эффективная селекция которых велась исключительно на гербицидах динитроанилинового либо фосфороамидного рядов с последующей стабильной экспрессией и интеграцией экзогенных мутантных тубулинов в клетках реципиентных видов, дальнейшее развитие технологических подходов базировалось на создании векторных конструкций для трансформации растений, в которых присутствовал бы мутантный ген тубулина в качестве маркерного гена [92].

Использование генов тубулина в генетической инженерии растений может решить ряд проблем, связанных с приобретением устойчивости к различным классам антимикротрубочковых гербицидов [51, 93-95], устойчивостью к холоду [95, 96], элонгацией клеток [97] и даже регуляцией клеточной архитектуры в целом, включая гравитропическую реакцию, ветвление, укоренение, высоту растения и урожайность [95]. Различные аспекты трансформации растений генами тубулина, включая химерные гены GFP-тубулина, описаны нами ранее в нескольких обзорах [51, 98]. Практические шаги по получению трансгенных растений с устойчивостью к динитроанилинам и фосфороамамидам были предприняты группой П. Хасси [59, 93, 94], однако им удалось осуществить регенерацию только модельного растения – табака.

Для разработки подходов по использованию мутантного тубулина для переноса признака устойчивости в другие виды растений и в качестве маркерного гена при селекции трансгенных растений нами также был использован клонированный и хорошо охарактеризованный мутантный ген $\alpha 1$ -тубулина из R-биотипа гусяной травы [62], обеспечивающий устойчивость к широкому спектру динитроанилиновых и

фосфоротиоамидных гербицидов. В работе также дополнительно использовали полноразмерный ген β 1-тубулина из ячменя, который встраивали в конструкции, уже несущие мутантный ген α -тубулина, или создавали с ним отдельные векторы, поскольку наличие экзогенных генов именно обеих субъединиц тубулина позволяет достичь их эквимоллярной ко-экспрессии для дальнейшего нормального функционирования мутантного тубулина в нативных структурах микротрубочек трансгенных растений [94]. Были созданы соответствующие конструкции для трансформации однодольных и двудольных растений, а перенос селективного маркерного гена осуществляли путём биолиственной либо агробактериальной трансформации [99]. Для биолиственной трансформации однодольных гены тубулинов в отдельно созданных векторах помещали под конститутивный убихитиновый промотор кукурузы, а для двудольных – под конститутивный 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты. Для агробактериальной трансформации была создана конструкция, в которой оба гена тубулина были расположены под 35S-промотором.

Эффективность систем трансформации с мутантным геном тубулина TuA1m проверяли, используя несколько видов однодольных и двудольных, включая ячмень (*Hordeum vulgare*), сою (*Glycine max*), лён (*Linum usitatissimum*), два вида табака (*Nicotiana glauca* и *N. glauca*), а также пальчатое просо (*Eleusine coracana*) [92]. Для каждого из указанных видов разрабатывали отдельный протокол трансформации и селекции трансгенных линий. В качестве селективного агента использовали наиболее эффективный гербицид из класса динитроанилинов – трифлуралин. Эффективные селективные концентрации трифлуралина для каждой линии растений устанавливали согласно разработанному нами ранее протоколу [91, 100], на основании которого был определен диапазон селективных концентраций для данного селективного агента (5–10 мкМ). Устойчи-

вые трансгенные линии удалось получить для всех перечисленных видов. Трансгенная природа отселектированных растений была подтверждена с помощью Саузерн-, Нозерн-блоттинга и ПЦР-анализа с использованием специфических зондов, включая зонды к гену α -тубулина и/или гену β -тубулина.

Суммируя изложенный материал, можно сделать обобщающий вывод, что знания о закономерностях функционирования генов тубулина растений и механизмов устойчивости этого белка к веществам с антимикротрубочковой активностью в совокупности с использованием методов функциональной и структурной геномики позволяют разработать эффективные генно-инженерные технологии, решающие несколько проблем создания генетически модифицированных растений. В первую очередь, это создание векторных конструкций для трансформации, содержащих новые маркерные гены, которыми являются гены тубулина, определяющие устойчивость к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия. Очевидно, что это направление обладает значительным потенциалом для дальнейшей разработки в силу того, что тубулин является важной мишенью для целого ряда веществ различной химической природы. Параллельно, использование уже обнаруженных мутантных генов тубулина с устойчивостью к динитроанилинам и фосфоротиоамидам может решить проблему создания новых сортов культурных растений, устойчивых к этим классам гербицидов, с помощью генетической инженерии.

Список использованных источников

1. Hasezawa S., Nozaki H. Role of cortical microtubules in the orientation of cellulose microfibrils deposition in higher plant cells // *Protoplasma*. 1999. Vol. 209. P. 98-104.
2. Terasaki M., Reese T.S. Interactions among endoplasmic reticulum, microtubules, and retrograde movements of the cell surface

// Cell Motil. Cytoskeleton.—1994. Vol. 29. P. 291-300.

3. Cole N.B., Lippincott-Schwartz J. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules // Curr. Opin. Cell Biol. 1995. Vol. 7. P. 55-64.

4. Bloom G. S., Goldstein L.S. Cruising along microtubule highways: How membranes move through secretory pathway // J. Cell Biol. 1998. Vol. 140. P. 1277-1280.

5. Hasegawa S., Hirashima N., Nakanishi M. Microtubule involvement in the intracellular dynamics for gene transfection mediated by cationic liposomes // Gene Ther. 2001. Vol. 8. P. 1669-1673.

6. Vale R. D. The molecular motor toolbox for intracellular transport // Cell. 2003. Vol. 112. P. 467-480.

7. Bajer A.S. The elusive organization of the spindle and the kinetochore fiber: a conceptual retrospective // Adv. Cell Biol. 1990. Vol. 3. P. 65-93.

8. Forer A., Wilson P.J. A model for chromosome movement during mitosis // Protoplasma. 1994. Vol. 179. P. 95-105.

9. Cleveland D. W., Mao Y., Sullivan K. F. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling // Cell 2003. Vol. 112. P. 407-421.

10. Baas P. W. Microtubules and axonal growth // Curr. Opin. Cell Biol. 1997. Vol. 9. P. 29-36.

11. Kropf D.L., Bisgrove S.R., Hable W.E. Cytoskeletal control of polar growth in plant cells // Curr. Opin. Cell Biol. 1998. Vol. 10. P. 117-122.

12. Gelfand V.I., Bershadsky, A.D. Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function // Annu. Rev. Cell Biol. 1991. Vol. 7. P. 93-116.

13. Cyr R.J. Microtubules in plant morphogenesis: role of the cortical array // Annu. Rev. Cell Biol. 1994. Vol. 10. P. 153-169.

14. Barlow P.W., Baluska F. Cytoskeletal perspective on root growth and morphogenesis // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2000. Vol. 51. P. 289-322.

15. Нипорко О. Ю., Блюм Я. Б. Структурні зміни цитоскелету в процесі розвитку культури мікроспор та їх роль в індукції ембріогенезу // Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть / Голов. ред. Моргун В. В. Київ: 2001. Том 1. С. 366-371.

16. Bastin P., Pullen T. J., Moreira-Leite F. F., Gull K. Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle // Microbes and Infection Vol. 2. P. 1865-1874.

17. Small J. V., Kaverina I. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity // Cur. Opin. Cell Biol. 2003. Vol. 15. P. 40-47.

18. Machesky L. M., Bornens M. Cell structure and dynamics // Cur. Opin. Cell Biol. 2003. Vol. 15. P. 2-5.

19. Stephens R. E. Thermal fractionation of outer fiber doublet microtubules into A and B subfiber components α and β tubulin // J. Mol. Biol. 1972. Vol. 47. P. 353-363.

20. Fosket D. E., Morejohn L. C. Structural and functional organization of tubulin // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. Vol. 43. P. 201-240.

21. Little M., Seehaus T. Comparative analysis of tubulin sequences // Comp. Biochem. Physiol. 1988. Vol. 90B. P. 655-670.

22. Burns R.G. α -, β - and γ -tubulins: sequence comparisons and structural constraints // Cell Motil. Cytoskeleton. 1991. Vol. 20. P. 181-189.

23. McKean P. G., Vaughan S., Gull K. The extended tubulin superfamily // J. Cell Sci. 2001. Vol. 114. P. 2723-2733.

24. Maccioni R.B., Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly // Physiol. Rev. 1995. Vol. 75. P. 835-864.

25. Mandelkow E., Mandelkova E.-M. Microtubules and microtubule-associated proteins // Curr. Opin. Cell Biol. 1995. Vol. 7. P. 72-81.

26. Hirokawa N., Noda Y., Okada Y. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division // Curr. Opin. Cell Biol. 1998. Vol. 10. P. 60-73.

27. Böhm K. J., Stracke R., Unger E. Motor proteins and kinesin-based nanoactuatoric devices // *Cytology and Genetics*. 2003. Vol. 2. P. 11-21.
28. Nogales E., Whittaker M., Milligan R. A., Downing K.H. High resolution model of the microtubule // *Cell*. 1999. Vol. 96. P. 79-88.
29. Luduena, R. F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications // *Int. Rev. Cytol.* 1998. Vol. 178. P. 207-275
30. Radchuk V., Sreenivasulu N., Blume Ya., Weschke W. Distinct tubulin genes are differentially expressed during barley grain development // *Physiol. Plant.* 2007. Vol.131. P. 571-580
31. Christov N.K., Imai R., Blume Ya B. Differential expression of two winter wheat alpha tubulin genes during cold acclimation. *Cell Biol. Int.* 2008. (*accepted*).
32. McRae T. H. Tubulin post-translational modifications: enzymes and their mechanisms of action. // *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol. 244. P. 265-278.
33. Rosenbaum J. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last // *Curr. Biol.* 2000 Vol.10. R801-R803.
34. Morejohn L.C, Fosket D.E. The biochemistry of compounds with antimicrotubule activity in plant cells // *Pharm. Ther.* 1991. Vol. 51. P. 217-230.
35. Correia J.J. Effects of antimitotic agents on tubulin-nucleotide interactions // *Pharm. Ther.* 1991. Vol. 52. P. 127-147.
36. Correa J.J., Lobert S. Physicochemical aspects of tubulin-interacting antimitotic drugs // *Curr. Pharmaceut. Design.* 2001. Vol 7. P. 1213-1223.
37. Oakley B.R. Microtubule mutants // *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 1985. Vol. 63. P. 479-488.
38. Страшнюк Н.М., Блюм Я.Б. Получение мутантов по генам белков микротрубочек // *Цитология и генетика*. 1993. Том 27. С. 79-96.
39. Baird W.V., Blume Ya.B., Wick S. Microtubular and cytoskeletal mutants // *Plant microtubules: potential for biotechnology* / Ed. P. Nick. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2000. P. 159-191.
40. Morejohn L.C., Fosket D.E. Tubulins from plants, fungi and protists: a review // *Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton* / Ed. J.W. Shay. New York : Plenum Press, 1986. P. 257-329.
41. Демчук О.Н., Блюм Я.Б. Построение филогенетического древа растительных тубулинов на основании гомологии их белковых последовательностей // *Цитология и генетика*. 2005. Том 39, № 2. С. 3-9.
42. Блюм Я.Б. Организация цитоскелета протопластов и соматические гибриды растений: интеграция функций клетки // *Биотехнология* / Под ред. Ю.Ю. Глебы. М.: ВИНТИ АН СССР, 1988. 9. С. 166-277 (*Итоги науки и техники*, т. 9).
43. Parka S. J., Soper O. F. The physiology and mode of action of the dinitroaniline herbicides // *Weed Sci.* 1977. Vol. 25. P. 79-87.
44. Upadhyaya M.K, Noodén L.D. Mode of dinitroaniline herbicide action // *Plant Physiol.* 1980. Vol. 66. P. 1048-1052.
45. Molin W.T., Khan R.A. Mitotic disrupter herbicides: recent advances and opportunities // *Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology*/ Ed. R.M. Roe. Burke (VA, USA): IOS Press, 1997. - P. 143-158.
46. Vaughn K.C Anticytoskeletal herbicides // *Plant microtubules: potential for biotechnology* / Ed. P. Nick. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2000. P. 193-205.
47. Morejohn L. C., Bureau T. E., Molé-Bajer, J., Bajer A. S., Fosket D. E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro* // *Planta* 1987. Vol. 172. P. 252-264.
48. Anthony R. G., Waldin T. R., Ray J. A., Bright S. W. J., Hussey P. J. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // *Nature*. 1998. Vol. 393. P. 260-263.
49. Bogitsh, B. J.; Middleton, O. L.; Ribeiro-Rodrigues, R. Effects of the antitubulin

- drug trifluralin on the proliferation and metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes // Parasitol. Res. 1999. Vol. 85. P. 475-480.
50. Traub-Cseko, Y. M.; Ramalho-Ortigao, J. M.; Dantas, A. P.; de Castro, S. L.; Barbosa, H. S.; Downing, K. H. Dinitroaniline herbicides against protozoan parasites: the case of *Trypanosoma cruzi* // Trends Parasitol. 2001. Vol. 17. P. 136-141.
51. Емец А.И., Блюм Я.Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимиотрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // Физиол. раст. 1999. Том 46, № 6. С. 899-907.
52. Takahashi A., Yamada S., Yamada H., Kawana T. Mitotic disruption by a novel pyrimidine herbicide, NS-245852, in oat (*Avena sativa* L.) roots // Weed Biol. Management. 2001. Vol. 1. № 3. P. 182-188.
53. Tresch S., Plath P., Grossmann K. Herbicidal cyanoacrylates with antimicrotubule mechanism of action // Pest Manag Sci. 2005. Vol. 61. № 11. P. 1052-1059.
54. Ньпорко А.Ю., Емец А.И., Климкина Л.А., Блюм Я.Б. Взаимосвязь чувствительности каллуса *Eleusine indica* к трифлуралину и амипрофосметилу с особенностями взаимодействия этих соединений с тубулином // Физиол. раст. 2002. Том 49, № 3. С. 459-466.
55. Vaughn K.C., Marks M.D., Weeks D.P. A dinitroaniline-resistant mutant of *Eleusine indica* exhibits cross-resistance and supersensitivity to antimicrotubule herbicides and drugs // Plant Physiol. 1987. 83. P. 956-964.
56. Smeda R.J., Vaughn K.C., Morrison I.N. Trifluralin-resistant green foxtail (*Setaria viridis* (L.) Beauv.). Exhibits cross-resistance to mitotic disrupter herbicides // Plant Physiol. 1992. Vol. 96. P. 114.
57. Cronin K.E., Hussey P.J., Ray J.A., Waldin T.R. Herbicide resistant plants // World Intellectual Property Org. Int. Publ., 1993. No. WO 93/24637.
58. Anthony R.G., Hussey P.J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton // Trends Plant Sci. 1999. Vol. 4. P. 112-116.
59. Antony R.G., Waldin T.R., Ray J.A., Bright S.W.J., Hussey P.J. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // Nature. 1998. Vol. 393. P. 260-263.
60. Baird W.M.V., Morejohn L., Zeng L., Mysore K., Kim H.-H. Genetic, molecular and biochemical characterization of dinitroaniline herbicide resistance in goosegrass (*Eleusine indica*) // Proc. Second Int. Weed Control Congr. Copenhagen, 1996. 2. P. 551-557.
61. Baird W.M.V., Zeng L., Koka K., Yamamoto E. Genetic and molecular analysis of dinitroaniline resistance in three biotypes of goosegrass (*Eleusine indica*) // Proc. Xth Symp. Biology of Weeds (Dijon, France, 11-13 September, 1996). Dijon, 1996. P. 181-188.
62. Yamamoto E., Zeng L., Baird W.V. α -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* // Plant Cell. 1998. Vol. 10. P. 297-308.
63. Mysore K., Baird V. Molecular characterization of the tubulin-related gene families in herbicide resistant and susceptible goosegrass (*Eleusine indica*) // Weed Sci. 1995. P. 28-33.
64. Delye C., Menchari Y., Michel S., Darmency H. Molecular basis for sensitivity to tubulin-binding herbicides in green foxtail // Plant. Physiol. 2004. Vol. 136. P. 3920-3932.
65. Lowe D.B., Swire-Clark G.A., McCarty L.B., Whitwell T., Baird W.V. Biology and molecular analysis of dinitroaniline-resistant *Poa annua* L. // Intl. Turfgrass Soc. Res. J. 2001. Vol. 9. P. 1019-1025.
66. Lee V. D., Huang B. Missense mutations at lysine 350 in β -tubulin confer altered sensitivity to microtubule inhibitors in *Chlamydomonas* // Plant Cell. 1990. 2. P.1051-1057.
67. Schilber M. J., Huang B. The colR4 and colR1 β -tubulin mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* confer altered sensitivities to microtubule inhibitors and herbicides by

enhancing microtubule stability // J. Cell Biol. 1991. 113. P. 605-614.

68. Blume Ya.B., Strashnyuk N.M., Sidorov V.A., Gleba Yu.Yu. Producing and analysis of amiprophosmethyl-resistant mutants with altered tubulin from mesophyll protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia* // Physiol. Plant. 1991. Vol. 82. P. 35.

69. Страшнюк Н.М., Блюм Я.Б., Смертенко А.П., Сидоров В.А., Глеба Ю.Ю. Получение амипрофосметил-устойчивых линий *Nicotiana plumbaginifolia*, содержащих мутантный тубулин // Докл. РАН. 1993. Том 332. С. 240–243.

70. Blume Ya.B., Strashnyuk N.M., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Sidorov V.A., Gleba Yu.Yu. Alteration of β -tubulin in *Nicotiana plumbaginifolia* confers resistance to amiprophosmethyl // Theor. Appl. Genet. 1998. Vol. 97. P. 464–472.

71. Блюм Я.Б., Страшнюк Н.М., Смертенко А.П., Солодушко В.Г., Глеба Ю.Ю. Изменения β -тубулина обеспечивают устойчивость к трифлуралину мутантов *Nicotiana plumbaginifolia*, полученных *in vitro* // Докл. НАН Украины. 1996. № 7. С. 132–137.

72. Blume Ya.B., Strashnyuk N.M., Gleba Yu.Yu. Selection and analysis of trifluralin-resistant mutants of *Nicotiana plumbaginifolia* // Abstr. Satellite Symp. of the 15th Int. Cong. of Biochem. (Sea of Galilee, Israel, August 1–4, 1991). Israel, 1991. P. 41.

73. Yemets A.I., Strashnyuk N.M., Blume Ya.B. Plant mutants and somatic hybrids with resistance to dinitroanilines // Cell Biol. Int. 1997. Vol. 21. № 12. P. 912–914.

74. Bolduc C., Lee V.D., Huang B. β -Tubulin mutants of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. Vol. 85. P. 131–135.

75. Vaughn K.C., Vaughan M.A. Mitotic disrupter from higher plants. Effect on plant cell // Biological Active Natural Products : Potential Use in Agriculture / Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. No. 380., 1988. P. 273–293.

76. Ellis J.R., Taylor R., Hussey P. Molecular modeling indicates that two chemi-

cally distinct classes of anti-mitotic herbicide bind to the same receptor site(s) // Plant. Physiol. 1994. Vol. 105. P. 15–18.

77. Solodushko V.G., Kovalenko N.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Expression of mutant tubulin with decreased affinity to amiprophosmethyl in heterological plant cell // Mol. Biol. Cell. 1996. 7 (Suppl.). P. 46a.

78. Yemets A.I., Nyporko A.Yu., Swire-Clark G., Baird W.V., Blume Ya.B. Mechanisms of plant resistance to dinitroanilines and phosphoramidates based on β -tubulin mutations // Book of Abstracts of XVII Int. Bot. Congress. Vienna, 2005. P. 292.

79. Blume Ya.B., Nyporko A.Yu., Yemets A.I., Baird W.V. Structural modeling of the interaction of plant α -tubulin with dinitroaniline and phosphoramidate herbicides // Cell Biol. Int. 2003. Vol. 27. P. 171-174.

80. Ныпорко А. Ю., Блюм Я. Б. Сравнительный анализ вторичной структуры тубулинов и FtsZ-белков // Биополимеры и клетка. 2001. Том 17. С. 61-69.

81. Ныпорко А. Ю., Живолуп А. Н., Блюм Я. Б. Сравнительный анализ первичной структуры мутантных тубулинов, устойчивых к антимикротрубочковым соединениям, для предсказания новых мутаций с аналогичными свойствами // Цитология и генетика 2003. Том 37. С. 69-78.

82. Blume Ya.B., Nyporko A.Yu., Yemets A. I., Baird W.V. Are earlier predicted sites of different plant tubulins involved in interaction with dinitroanilines? // Mol. Biol. Cell. 2002. Vol. 13(Suppl.). P. 463a.

83. Morissette N.S., Mitra A., Sept D., Sibley L.D. Dinitroanilines bind α -tubulin to disrupt microtubules // Mol. Biol. Cell. 2004. Vol. 15. P. 1960-1968.

84. Mitra A., Sept D. Binding and interaction of dinitroanilines with apicomplexan and kinetoplastid α -tubulin // J. Med. Chem. 2006. Vol. 49. P. 5226-5231.

85. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R.S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K. and Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function // J. Comp. Chem. 1998. Vol. 19. P. 1639-1662.

86. Nyporko A.Yu., Yemets A. I., Blume Ya.B. Protozoan and plant tubulins as specific targets for dinitroanilines and phosphoramidates: common structural features and interactive sites // Abstr. of 4th ISGO International Conference of Structural Genomics. Beijing, 2006. P. 257-259.

87. Емец А.И., Кундельчук О.П., Смертенко А.П., Солодушко В.Г., Блюм Я.Б., Глеба Ю.Ю. Соматические гибриды высших растений с использованием мутанта *Nicotiana plumbaginifolia*, устойчивого к амипрофосметилу // Генетика. 1996. 32, № 8. С. 1104–1111.

88. Емец А.И., Блюм Я.Б., Смертенко А.П., Кундельчук О.П., Рудас В.А., Глеба Ю.Ю. Получение γ -гибридов высших растений с мутантным β -тубулином // Докл. РАН. 1997. Том 353. № 4. С. 557–561.

89. Blume Ya. B., Kundelchuk O.P., Solodushko V.G., Sulimenko V.V., Yemets A.I. Asymmetric somatic hybrids of higher plants resistant to trifluralin // Proc. Int. Symp. on Weed & Crop Resist. to Herbicides (Cordoba, Spain, 1995) / Eds R. De et al. Univ. Cordoba, 1996. P. 182–185.

90. Yemets A.I., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Kundelchuk O.P., Blume Ya.B. Asymmetric somatic hybrids with mutant β -tubulin resistant to amiprofosmethyl // Plant Molecular Biology and Biotechnology / Eds K.K. Tewari, G.S. Singhal et al. New Delhi: Narosa Publ. House, 1997. P. 220–234.

91. Yemets A.I., Kundel'chuk O.P., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Rudas V.A., Gleba Yu.Yu. Blume Ya.B. Transfer of amiprofosmethyl-resistance from *Nicotiana plumbaginifolia* mutant by somatic hybridization // Theor. Appl. Genet. 2000. Vol. 100. P. 847–857.

92. Емец А. И., Блюм Я. Б. Мутантные гены тубулинов растений как маркерные селективные гены для генетической инженерии // Цитология и генетика. 2007. Том 41. № 3. С. 29-43.

93. Anthony R.G., Hussey P.J. Double mutation in *Eleusine indica* α -tubulin in-

creases the resistance of transgenic maize calli to dinitroaniline and phosphoramidate herbicides // Plant J. 1999. Vol. 18. P. 669–674.

94. Anthony R.G., Reichelt S., Hussey P. Dinitroaniline herbicide-resistant transgenic tobacco plants generated by co-overexpression of a mutant α -tubulin and a β -tubulin // Nature Biotech. 1999. Vol. 17. P. 712–716.

95. Breviario D., Nick P. Plant tubulins: a melting pot for basic questions and promising applications // Transgenic Res. 2000. Vol. 9. P. 383–393.

96. Nyporko A.Yu., Demchuk O.N., Blume Ya.B. Cold adaptation of plant microtubules: structural interpretation of primary sequence changes in a highly conserved region of α -tubulin // Cell Biol. Int. 2003. Vol. 27. № 3. P. 241–243.

97. Ji S., Lu Y., Li J., Wei G., Liang X., Zhu Y. A beta-tubulin-like cDNA expressed specifically in elongating cotton fibers induces longitudinal growth of fission yeast // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. Vol. 296. P. 1245–1250.

98. Kordyum E.L., Shevchenko G.V., Yemets A.I., Nyporko A.Yu., Blume Ya.B. Application of GFP technique for cytoskeleton visualization onboard the International Space Station // Acta Astronaut. 2005. Vol. 56. P. 613–621.

99. Yemets A, Radchuk V, Bayer O, Bayer G, Pakhomov A, Baird WV, Blume YB (2008) The development of transformation vectors based upon a modified α -tubulin gene as the selectable marker. Cell Biol. Int. (accepted).

100. Yemets A.I., Klimkina L.A., Tarassenko L.V., Blume Ya.B. Efficient callus formation and plant regeneration from goosegrass *Eleusine indica* (L.) // Plant Cell Rep. 2003. Vol. 21. № 6. P. 503–510

Дата поступления статьи 14 ноября 2007 г.

И.П. Шейко, Т.И. Епишко

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ В СЕЛЕКЦИОННОЙ РАБОТЕ ЖИВОТНОВОДСТВА БЕЛАРУСИ

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству»
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Фрунзе, 11

ВВЕДЕНИЕ

Для выполнения программы развития отрасли животноводства, предусматривающей получить к 2010 г. надой молока на корову 10-12 тыс. кг. молока, создать мясные генотипы свиней с содержанием мяса в туше 62-65 %, получить среднесуточный прирост молодняка на откорме 900 г., и не допустить снижение многоплодия маток необходимо ускорить селекционный и породообразовательный процессы в 1,5-2 раза. Ускорению селекционного процесса будет способствовать повышение генетического потенциала пород свиней и крупного рогатого скота, и рациональное использование его резервов.

Практика селекционной работы показывает, что использование традиционных методов селекции: отбора и подбора животных по собственной продуктивности, где не всегда принимаются во внимание результаты оценки по качеству потомства в силу продолжительности получения результатов, и не учитываются модификационные факторы, не способствует реализации максимального генетического прогресса в свиноводстве.

Так, за период с 1995 г. согласно результатам контрольного откорма свиней на Гродненской КИСС удалось увеличить среднесуточные приросты на откорме на 22-50 г, массу задней трети полутуши на – 0,3-0,5 кг, «площадь мышечного глазка» – на 1,2-2,2 см², а толщину шпика снизить только у животных белорусской мясной породы на 1 мм [33-А]. По данным Ю.В. Лебедева, селекция в чистопородных стадах при отборе не менее 50% оцененных животных и даже при существующей практике смены поколений через 2,5-3 года

позволит повысить за 10 лет среднесуточный прирост только на 28 г, снизить расход корма на 1 кг прироста на 0,16 к. ед. и толщину шпика – на 3 мм [97]. Согласно данным Овчинникова, для того, чтобы увеличить многоплодие на 0,8 головы, необходимо в течение 16 лет вести отбор по данному признаку при 50% браковке маток [122, с.131].

Интенсификации селекционного процесса будет способствовать применение ДНК-технологий, позволяющих осуществлять воздействие на генотип животного непосредственно на уровне ДНК, т.е. генов.

Селекция на уровне генотипа, т.е. по маркерным генам, позволит за одно поколение достичь увеличения продуктивности животных до 20% и при этом устранить негативное влияние генетического груза, вызванное интенсивной селекцией на повышение продуктивности животных.

Для этого необходимы поиск маркерных генов, связанных с продуктивными качествами животных и детерминирующих мутации наследственных и инфекционных заболеваний свиней и крупного рогатого скота и разработка селекционных программ их применения в селекционном процессе, что и явилось целью наших исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены в РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству» и ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». Объектом исследований явились животные следующих пород свиней: крупная белая (КБ), белорусская

мясная (БМ), белорусская черно-пестрая (БЧ), ландрас (Л), йоркшир (Й), дюрок (Д), пьетрен (П) и двухпородные помеси этих пород, а также быки производители и быкопроизводящие коровы черно-пестрой породы.

ДНК-тестирование свиней по генам - RYR, H-FABP, ESR, PRL и животных крупного рогатого скота по генам – CD-18, детерминирующего синдром иммунодефицита (BLAD) и каппа-казеина (CSN) проводилось методом ПЦР-ПДРФ согласно разработанным нами «Методическим рекомендациям по проведению ДНК-тестирования в животноводстве Беларуси», в основу которых положены методики Г. Брэма и Б. Брэннинга.

РЕЗУЛЬТАТЫ и ОБСУЖДЕНИЕ

Интенсивная селекция на создание мясных генотипов в свиноводстве и использование пород свиней ландрас и пьетрен привели, наряду с положительным эффектом увеличения содержания мяса в туше, к отрицательным последствиям: снижению качества мяса и появлению пороков PSE и DFD. Считается, что одной из

доминирующих причин снижения качества мяса является рост частоты встречаемости подверженных стрессу животных, вызванный мутацией в гене RYR1. Проведенное нами ДНК – тестирование животных различных пород выявило значительный процент предрасположенных к стрессу животных (в среднем до 20 % у мясных пород), а у пород белорусской мясной (0,5 %) и ландрас (9 %) чувствительных к стрессу, которые встречаются исключительно редко (Табл.1).

Однако, согласно менделевской схеме распределения генотипов при скрещивании гетерозиготных родительских пар, 25 % полученных потомков должны быть рецессивными гомозиготами, которые в большинстве погибают на ранней стадии онтогенеза, а 50 % полученного молодняка, будет предрасположено к стрессу.

Установлено, что частота встречаемости мутации в гене RYR1 зависит от породной принадлежности, популяции, линии и половозрастной группы и колеблется от 0 до 33 % у чистопородных животных и достигает 80 % у помесей с участием пород ландрас и пьетрен.

Таблица 1

Встречаемость стрессчувствительных (RYR^{mm}) и предрасположенных к стрессу (RYR^{Nn}) свиней различной породной принадлежности

| Порода и породные сочетания | Частота встречаемости генотипов, % | | |
|-----------------------------|------------------------------------|---------------------|-------------------|
| | RYR ^{Nn} | | RYR ^{mm} |
| | В среднем | Размах изменчивости | |
| БМ | 21 | 0-26 | 0,5 |
| КБ | 6 | 0-27 | - |
| Л | 14 | 0-33 | 9 |
| БЧ | 12-20 | 0-15 | - |
| И | 33 | - | - |
| Д | 3,5 | 3-5 | - |
| П | 54 | 33-75 | 37 |
| Д*П | 57 | 30-80 | - |
| П*Д | 100 | - | - |
| БЧ*П | 63 | - | - |
| КБ*П | 25 | - | - |
| Л*П | 67 | - | - |

Нами выявлено, что при несоответствии условий эксплуатации животных-носителей генотипов RYR^{Nn} и RYR^{mm} адаптационным возможностям, наблюдается

снижение метаболических и обменных процессов (до 22 %), естественной резистентности (до 20 %), оплодотворяющей способности (до 3 %), воспроизводитель-

ной (до 11 %), откормочной (до 5-7 %) и мясной (до 8-10 %) продуктивности, ухудшения качества мяса (PSE, DFD). Отмечается увеличение на 2,5 % количества мертворожденных поросят и на 3,4 % - аварийных опоросов.

Достаточно высокий процент наличия предрасположенных к стрессу животных и отрицательное влияние мутации в гене RYR1 указывает на недопущение использования таких животных для воспроизводства и необходимость обязательного ДНК-тестирования племенного и импортируемого поголовья.

Высокая энергия роста откормочного молодняка при производстве постной свинины, привели к значительному ухудшению качества мяса, практически исчезли такие показатели как: ароматность, сочность и нежность. Одной из причин ухудшения технологических свойств свинины является резкое снижение в ней содержания внутримышечного жира, который является критерием качества мяса, связан с его вкусовыми качествами и определяет такой показатель как мраморность мяса.

Низкий коэффициент корреляции (0,11) показателей мраморности мяса и толщины шпика указывает на возможность проведения селекции на повышение мраморности мяса без увеличения толщины шпика. Однако, из-за низкой вариабельности признака, использование традиционных методов селекции не позволяет добиться значимых успехов.

Для решения данной проблемы в селекционном процессе использованы гены-маркеры H-FABP (аллели H и D), детерминирующие содержание внутримышечного жира, которые кодируют белки и ферменты, участвующие в обмене липидов и регулируют рост и дифференцировку тканей. Нами установлено положительное влияние генотипов H-FABP^{dd} и H-FABP^{HH} данного белка на снижение толщины шпика (в среднем до 16,5 %), увеличение длины туши (до 3 %), массы задней трети полутуши до 4,7 %, площади «мышечного глазка» (до 11,4 %), мясности животных (до 9,5 %) в сравнении с альтернативными генотипами (Табл. 2).

Таблица 2

Ассоциация полиморфизма гена H-FABP с показателями мясной продуктивности свиней белорусской мясной породы

| Показатели | Генотип | | | |
|---------------------------------|----------------|--------------|---------------|------|
| | HHdd | HHDD | HhDd | HhDd |
| Длина туши, см | 7* 99,1±0, | 8 96,3±0, | 9 97,9±0, | |
| Толщина шпика, мм | 17* 20,3±2, | 3 29,5±2, | 4 24,2±1, | |
| Масса задней трети полутуши, кг | 5 11,6±0, | 4 11,1±0, | ,3 11,05±0 | |
| Площадь «мышечного глазка» | 39 41,3±3, | 7 36,6±1, | 5 40,4±2, | |
| Мясность | 57* 58,5±0, | 9 53,2±1, | 6 57,8±0, | |

Выявлено, что подсвинки, полученные от хряков с генотипом H-FABP^{HH}, быстрее достигали живой массы 100 кг на откорме на 4,7 дня, имели более высокую скорость прироста (на 43 г и более), низкие затраты корма (на 0,16 к.ед) в сравнении с молодняком, полученным от хряков-производителей генотипа H-FABP^{Hh}, что

позволяет рекомендовать применение гена H-FABP в качестве маркера при отборе производителей. Это будет способствовать реализации высокого генетического потенциала откормочной продуктивности у потомков.

В ходе интенсивного породообразовательного процесса, направленного на соз-

дание мясных генотипов свиней, наряду с высокими мясными качествами, животные должны обладать и высокой воспроизводительной функцией. Однако, из-за ограниченного полом проявления данных признаков и низким коэффициентом наследования (0,1-0,2), обуславливающего долю генетической изменчивости, сложно не только добиться быстрого и значительного увеличения репродуктивной функции материнских пород, но и не допустить ее снижение у мясных пород. Одним из подходов повышения эффективности селекционной работы является применение ДНК-маркеров, позволяющих вести отбор и подбор родительских пар на генном уровне.

В соответствии с положениями популяционной генетики предполагается, что количественные признаки, к которым относится и размер гнезда, обуславливаются целым комплексом генов, каждый из которых в большей или меньшей мере оказывает влияние на проявление данного признака. Известны гены, детерминирующие репродуктивные качества: ESR - эстроге-

новый рецептор, PRL - пролактиновый рецептор, FSH – фолликулостимулирующий гормон, RYR1 - ген устойчивости к стрессу, оказывающий косвенное влияние на проявление репродуктивных качеств у животных-носителей мутации злокачественной гипертермии и чувствительных к стрессу. Согласно данным зарубежной литературы каждый из этих генов вносит определенный вклад в формирование репродуктивных признаков.

В связи с этим, нами проведены исследования, направленные на изучение комплексного влияния данных генов на репродуктивную функцию животных и выявлена возможность их применения в селекционной практике свиноводства в качестве маркеров. Получены данные, свидетельствующие о том, что использование свиноматок генотипа ESR^{BB}RYR1^{NN} позволит увеличить количество родившихся поросят на 18,8 % либо 1,9 поросенка (P<0,001), массу гнезда при рождении на 17,9 % либо 2,6 кг, на 6,7 %, (P<0,01), на 18,1 % (P<0,05) снизить процент аварийных опоросов (Табл. 3).

Таблица 3

Продуктивность свиноматок белорусской мясной породы различных генотипических сочетаний по генам ESR и RYR1

| Показатели | Генотип | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|
| | ESR ^{AA} RYR1 ^{NN} | ESR ^{AA} RYR1 ^{Nn} | ESR ^{AB} RYR1 ^{NN} | ESR ^{AB} RYR1 ^{Nn} | ESR ^{BB} RYR1 ^{NN} | ESR ^{BB} RYR1 ^{Nn} |
| Количество опоросов | 453 | 98 | 243 | 64 | 89 | 11 |
| Многоплодие, гол. | 11,4±0,2 ^{xxx} | 10,1±0,3 ^{***} | 11,2±0,2 ^{xx} | 11,1±0,6 | 12,0±0,4 | 12,3±0,8 ^x |
| Масса гнезда при рождении, кг | 17,1±0,3 ^{xxx} | 14,5±0,5 ^{**} | 17,0±0,3 ^{xxx} | 15,7±0,7 | 17,1±0,7 | 17,0±1,3 |
| Количество поросят в 21 день, гол. | 10,0±0,1 ^{***} | 10,1±0,1 ^{***} | 10,0±0,1 ^{***} | 9,9±0,2 ^{**} | 10,6±0,1 | 10,2±0,4 |
| Молочность, кг | 57,8±0,6 | 57,7±1,3 | 58,4±0,8 | 55,5±1,4 | 58,0±0,9 | 61,0±4,4 |
| Количество поросят при отъеме в 2 месяца, гол. | xxx 9,8±0,1 [*] | 8,6±0,2 ^{***} | xxx 9,7±0,1 ^{**} | 9,8±0,2 ^{xxx} | 10,3±0,2 | 10,7±0,2 ^{xxx} |
| Масса гнезда при отъеме в 2 месяца, кг | 180,8±2,6 | 174,2±3,5 | 182,8±2,9 | 173,1±5,0 | 186,2±6,4 | 185,1±7,8 |
| Сохранность поросят, % | 88,5±1,6 | 86,5±2,7 | 88,2±1,5 | 94,2±5,7 | 88,5±3,1 | 87,0±6,0 |
| Процент мертворожденных поросят, % | 4,1±0,6 ^{xx} | 10,5±2,4 ^{**} | 4,1±0,6 ^{xx} | 4,4±1,9 | 3,8±0,7 | 3,9±2,8 |
| Процент аварийных опоросов, % | 19,7±2,3 | 30,6±5,2 [*] | 19,3±3,2 | 21,5±5,3 | 12,5±5,6 | 21,9±7,2 |

Разница с показателями генотипа ESR^{AA}RYR1^{NN} достоверна при: ^x - P<0,05; ^{xx} - P<0,01; ^{xxx} - P<0,001.
Разница с показателями генотипа ESR^{BB}RYR1^{NN} достоверна при: * - P<0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001.

Выявлена тенденция положительного влияния аллелей ESR^B и $RYR1^N$ на молочность, массу гнезда при отъеме и сохранность поросят.

Таким образом, установлено, что наиболее благоприятное воздействие на репродуктивную функцию свиноматок белорусской мясной породы оказывает комплексный генотип $ESR^{BB}RYR1^{NN}$, а наименее желательным для селекции на улучшение воспроизводительных качеств является генотип $ESR^{AA}RYR1^{Nn}$. Это согласуется с данными ранее проведенных нами исследований индивидуального влияния генов ESR и $RYR1$ на репродуктивные признаки свиноматок. Следует отметить, что использование комплексного генотипа открывает более широкие возможности при отборе, позволяя провести точную оценку продуктивности свиноматок, так как обнаруживает ряд взаимосвязей, не проявляющихся при дифференцированном анализе по каждому гену.

В Республике остро стоит проблема повышения жизнеспособности новорожденного молодняка, так как наибольший процент падежа приходится на период новорожденности и может продолжаться до 3-4 месячного возраста. В связи с чем, практический интерес для свиноводства представляет изучение возможности применения в селекционном процессе гена рецептора *E.coli* ($ECR F18/FUT1$), связанного с возникновением колибактериоза у поросят после отъемного периода и первых двух месяцев жизни в качестве маркера для создания резистентных к данному заболеванию популяций свиней. Предварительно получены данные, свидетельствующие о том, что у свиноматок с генотипом ECR^{AA} рождается в среднем на 0,51 живых поросят больше в сравнении с альтернативными генотипами.

Проведенные исследования свидетельствуют о перспективности проведения селекции с применением маркерных генов, позволяющей значительно интенсифици-

ровать селекционный процесс, направленный на повышение продуктивных качеств животных и создание резистентных к наследственным заболеваниям популяций не только в свиноводстве, но и в скотоводстве.

В настоящее время в молочном скотоводстве особое внимание уделяется повышению белково-молочности, так как массовая доля белков в молоке и их структура имеют большое экономическое значение для перерабатывающей промышленности и в значительной степени определяют количество и качество выхода готовой продукции.

Исследования зарубежных ученых свидетельствуют о взаимосвязи содержания белка в молоке и его технологических свойств в зависимости от генотипа животного по локусу гена каппа-казеина ($CSN3$). Особи, несущие в своем генотипе аллель $CSN3^B$, превосходят животных с генотипом $CSN3^{AA}$ по содержанию белка в молоке (0,2-0,4 %). Молоко коров генотипа $CSN3^{BB}$ имеет лучшие коагуляционные свойства и дает возможность получения более высокого выхода творога и сыра (до 10 %).

Проведенное ДНК-тестирование быков-производителей белорусской чернопестрой породы РСУП «Брестплемпредприятие», «Гродноплемпредприятие» и «Минскплемпредприятие» РСУП «Витебскплемпредприятие», РСУП «Гомельплемпредприятие», РСУП «Могилевплемпредприятие» по локусам гена $CSN3$ выявило, что в среднем по племпредприятиям только 17,8 % быков-производителей являются носителями аллеля $CSN3^B$. Анализ распределения генотипов у протестированных животных позволил установить преобладание генотипа $CSN3^{AA}$ (57,1-73,7 %) над особями генотипа $CSN3^{AB}$ (26,3-41,3 %), а наиболее редкий генотип $CSN3^{BB}$ был идентифицирован только у двух животных (Рис.1, Табл. 4).

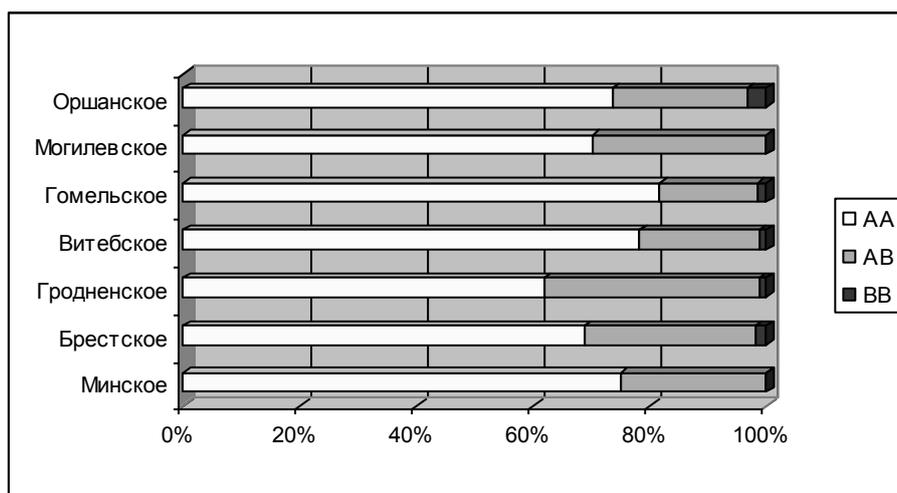


Рис. 1. Генетическая структура различных популяций крупного рогатого скота по локусу гена каппа-казеина

Таблица 4

Частота встречаемости генотипов гена каппа –казеина

| Принадлежность | Половозрастная группа | n | Частота встречаемости генотипов, % | | |
|---|-----------------------|------------|------------------------------------|-------------|------------|
| | | | AA | AB | BB |
| РСУП «Минскплемпредприятие» | быки-производители | 20 | 75,0 | 25,0 | - |
| РСУП «Брестплемпредприятие» | -/- | 160 | 68,8 | 29,4 | 1,8 |
| РСУП «Гродноплемпредприятие» | -/- | 79 | 62,0 | 36,7 | 1,3 |
| РСУП «Витебскплемпредприятие» | -/- | 83 | 78,3 | 20,5 | 1,2 |
| РСУП «Гомельплемпредприятие» | -/- | 71 | 81,7 | 16,9 | 1,4 |
| РСУП «Могилевплемпредприятие» | -/- | 94 | 70,2 | 29,8 | - |
| В среднем по быкам-производителям | | 507 | 71,7 | 27,2 | 1,1 |
| РУСХП «Оршанское племпредприятие» | ремонтные бычки | 232 | 74,1 | 22,8 | 3,1 |
| В среднем по быкам-производителям и ремонтным бычкам | | 739 | 72,4 | 25,8 | 1,8 |

Результаты проведенного тестирования свидетельствуют о необходимости проведения селекции, на увеличение концентрации аллеля CSN3^B и частоты встречаемости животных с генотипом CSN3^{BB}, для интенсификации селекционного процесса направленного на увеличение белково-молочности черно-пестрой породы крупного рогатого скота.

Интенсивная селекции в молочном скотоводстве на увеличение молочной продуктивности связана с проведением голштинизации чернопестрого скота. Однако, распространение ограниченного ко-

личества выдающихся представителей голштинской породы привело к распространению частот встречаемости генетически детерминированного заболевания - синдрома иммунодефицита крупного рогатого скота (мутации BLAD). Болезнь фенотипически проявляется только у гомозиготных животных, и они гибнут в первые месяцы постнатального развития.

У гетерозигот фенотипических отклонений не выявлено. Опасность распространения негативных рецессивных аллелей связана с использованием современной технологии размножения животных.

От одного быка могут быть получены десятки тысяч потомков, поэтому частота нежелательных аллелей может резко увеличиться в течение малого числа поколений. Аллель с минимальной частотой встречаемости может превратиться в наиболее распространенный в течение короткого периода времени. Селекция на уровне фенотипа является неэффективной в связи

с низкой частотой гомозигот по отношению к гетерозиготам.

Результаты ДНК-диагностики быков - производителей племпредприятий республики свидетельствуют наличии рецессивного аллеля, частота встречаемости которого изменяется от 0,9 до 3 %, в зависимости от популяции (Рис. 2, Табл. 5).

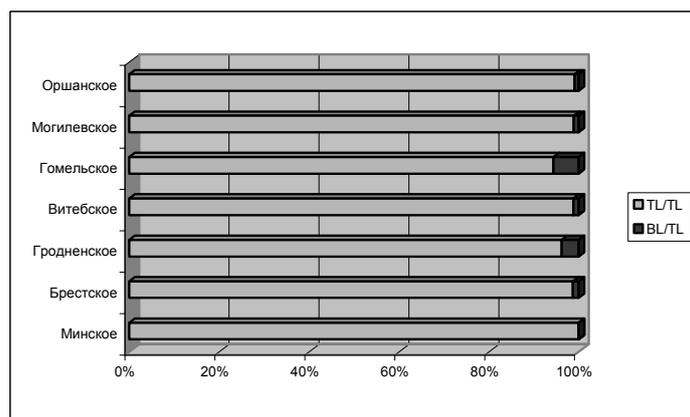


Рис. 2. Генетическая структура различных популяций крупного рогатого скота по локусу гена CD18

Таблица 5

Частота встречаемости генотипов CD-18, детерминирующего синдром иммунодефицита

| Принадлежность | Половозрастная группа | n | Частота встречаемости генотипов, % | |
|---|-----------------------|------------|------------------------------------|------------|
| | | | TL/TL | BL/TL |
| РСУП «Минскплемпредприятие» | быки-производители | 19 | 100 | - |
| РСУП «Брестплемпредприятие» | -//- | 160 | 98,7 | 1,3 |
| РСУП «Гродноплемпредприятие» | -//- | 79 | 96,2 | 3,8 |
| РСУП «Витебскплемпредприятие» | -//- | 83 | 98,8 | 1,2 |
| РСУП «Гомельплемпредприятие» | -//- | 71 | 94,4 | 5,6 |
| РСУП «Могилевплемпредприятие» | -//- | 94 | 98,9 | 1,1 |
| В среднем по быкам-производителям | -//- | 506 | 97,8 | 2,2 |
| РУСХП «Оршанское племпредприятие» | ремонтные бычки | 234 | 99,1 | 0,9 |
| В среднем по быкам-производителям и ремонтным бычкам | | 740 | 98,2 | 1,8 |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для сохранения и рационального использования генофонда крупного рогатого скота и свиней Беларуси необходимо проведение паспортизации племенного пого-

ловья республики на основе создания банка ДНК. Практика зарубежного животноводства показывает экономическую и хозяйственную эффективность этих мероприятий, о чем свидетельствуют законода-

тельные акты многих стран, предписывающие создание генетического паспорта племенных животных.

Создаваемый в РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству» банк ДНК племенного поголовья крупного рогатого скота и свиней будет представлять собой уникальный материал как для отечественных практиков и ученых, так и для мировой общественности. Полученные образцы ДНК будут использованы как в практическом племенном животноводстве, так и для разработки и апробации целесообразности использования молекулярно-генетических тест-систем для маркер-зависимой селекции, то есть селекции, базирующейся не на фенотипическом проявлении признака, а на генотипе.

Кроме того, это позволит:

- Создать базу данных для хранения наследственной информации выдающихся племенных животных;
- Сохранить генетическое разнообразие пород и популяций, генетическую информацию каждого племенного животного для будущих поколений, что будет иметь не только огромное практическое значение, но и послужит ценной базой для дальнейших научных исследований;
- Составить базу данных для проведения генотипирования животных различных пород и популяций;
- Установить генеалогические связи через идентификацию или подтверждение предполагаемых родословных, что нельзя сделать сегодня, используя традиционные методы;
- Выявить ассоциации генотипов с продуктивностью внутри каждой породы, а также между породами;
- Устранить генетический груз наследственных заболеваний, оздоровить селекционно-племенное поголовье рес-

публики и повысить сохранность молодняка;

- Предоставит возможность нового использования количественных характеристик, таких как предсказуемость и эффективность, что ранее было невозможно;
- Провести мониторинг генетической структуры племенного поголовья республики с последующей его паспортизацией.

Имеющиеся в банке образцы ДНК: 3087 – крупного рогатого скота и 3519 – свиней, позволили провести мониторинг племенных животных и на основании ДНК-маркеров приступить к созданию высокопродуктивных стад, устойчивых к наследственным и инфекционным заболеваниям.

Список использованных источников

1. Лебедев, Ю.В. Экспериментальная оценка генетического улучшения продуктивности свиней / Ю.В. Лебедев, П.П. Селезнева // Генетические исследования в селекции животных : бюлл. науч. работ. Вып. 65 / ВИЖ. – Дубровицы, 1982. – С. 31-34.
2. Овчинников, А.В. Научные и практические аспекты подбора в племенном и промышленном свиноводстве : дис. ... д-ра с.-х. наук / Овчинников А.В. – М., 2006. – 231 с.
3. Епишко, Т.И. Результаты оценки откормочно и мясной продуктивности и ее изменчивости у свиней белорусской мясной породы / Т.И. Епишко [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. Т. 37– Мн., 2002. – С.117-120

Дата поступления статьи 26 апреля 2007 г.

О.Г. Давыденко, Е.И. Кушнеревич, Л.Н. Сивицкая, Н.Г. Даниленко

ЭТНОГЕНОМИКА БЕЛОРУССКОГО НАРОДА. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИТОГИ.

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

ВВЕДЕНИЕ

История любого этноса – важный элемент культуры и самосознания для его носителей, она представляет собой неотъемлемую часть истории всего человечества. Существенный вклад в изучение истории человечества вносят разные науки. Геология позволяет отследить вглубь веков изменения климата и ландшафта и тем самым оценить условия, в которых формировались люди. Сравнительная лингвистика выявляет степень родства языков у различных народов и примерное время их дивергенции. Антропология исследует вариации физического строения людей в различных популяциях и выявляет сходство и различия народов. Этнография изучает духовные и культурные общности тех или иных групп населения. С самого начала зарождения генетики одним из ее интенсивно развивающихся направлений стало изучение генетического разнообразия популяций человека. Направление генетики, которое занимается реконструкцией истории популяций человека, используя полиморфизм ДНК, получило название «филогеография» [1] (или, прежде, «археогенетика»), а в русскоязычной научной литературе большее распространение получил термин «этногеномика».

Несмотря на относительную автономность и самодвижение этнического и генетического информационных потоков, их параллельность и некоторые общие причины, вызывающие их изменения (пространственная изоляция, эффект основателя и др.) позволяют, исследуя генетические особенности популяций людей, внутреннюю структуру этих популяций и их связи с другими популяциями, получать

достаточно обширную информацию, особенно о древней истории.

К настоящему времени накоплен огромный массив данных, по археологии, геологии, этнографии, антропологии Беларуси [2, 3, 4]. Установлены особенности геологического формирования территории современной Беларуси, по данным археологии высказаны предположения о заселении современным человеком, а также о различных археологических культурах в доисторическое время [2]. Установлено, что земледелие было распространено на территории современной Беларуси уже во время Неолита (6000-4000 лет д.н.э.). Историками и этнографами сформулированы основные гипотезы возникновения белорусов. В настоящее время существует несколько взглядов на проблему становления и формирования белорусского народа.

Согласно «Польской» концепции, белорусы не являются одним из восточнославянских этносов, а представляют собой лишь часть польского этноса [5], тогда как согласно «Великорусской» концепции белорусы являются частью великорусского этноса, а Беларусь – часть великорусской этнической территории. [6, 7]. Хотя эти взаимоисключающие точки зрения высказаны более 100 лет назад, они и сегодня присутствуют в умах некоторых людей и политиков.

«Кривичская» концепция возникновения Беларуси основана на представлении, что почти все особенности, которые отличают белорусов от украинцев и русских, вытекают из традиционной культуры одной из первоначальных восточнославян-

ских этнических общностей – кривичей [8].

Белорусские ученые Е.Ф. Карский и В.И. Пичета предками белорусов считали не только кривичей, но и дреговичей и радимичей, и, следовательно, этническая территория белорусов сформировалась на основе этнической территории этих групп славян [9].

Так называемую «древнерусскую» концепцию возникновения Беларуси обосновал С.А. Токарев. Она основана на том, что кривичи, радимичи, дреговичи и другие первоначальные восточнославянские общности этнически изменились еще до формирования белорусского, русского и украинского народов [10].

В современный период значительное распространение получила так называемая «балтская» теория этногенеза белорусов, согласно которой возникновение белорусов в отличие от русских и украинцев отличается тем, что на территории современной Беларуси до славян жили балты. Смешение славян с балтами и привело к формированию белорусского этноса, своеобразию его культуры и языка, а балты сыграли роль субстрата (подосновы) в этногенезе белорусов. Попытка обосновать эту гипотезу была предпринята московским археологом В.В. Седовым [11]. Он считает, что многие элементы традиционной культуры и языка белорусов имеют балтские корни.

Белорусский этнолог М.Ф. Пилипенко разработал концепцию «древнебелорусского» народа. Согласно этой концепции, этническая территория современной Беларуси сформировалась в позднее средневековье в результате консолидации северной части «полесского» и южной части подвинско-поднепровского субэтносов общеславянской древней русской этнической общности. Кроме них, в состав белорусского этноса вошли отдельные группы западнославянского (польского), балтского и тюркского (татарского) населения [12].

Как видно из вышесказанного, в настоящее время не существует единого мнения о формировании белорусов как этноса. Привлечение других методов, в том числе и методов популяционной генетики, могло бы привнести дополнительные данные в решение этого вопроса. Хотя мы и далеки от мысли, что изучение этногеномики белорусов сможет окончательно поставить все точки над «i» во многих чисто терминологических спорах историков о происхождении белорусов, мы убеждены в том, что это изучение сможет дать много полезной информации о происхождении людей, называющих себя белорусами.

Использование генома человека в изучении истории популяций основано на особенностях его строения и функционирования:

1. **Необратимость мутационного процесса.** Позволяет судить о направлении развития и преобразования популяции, исходя из направления изменений участков ДНК. Поскольку обратные мутации возникают с очень низкой вероятностью, исследованная совокупность индивидуумов или популяций может быть представлена в виде цепи, или скорее сети, последовательных изменений того или иного участка генома.

2. **Обилие молекулярных маркеров.** Использование полиморфных участков ДНК имеет огромные преимущества в сравнении с фенотипическими, а также популярными ранее белковыми маркерами. Число фенотипических маркеров ограничено. Многие количественные параметры человеческих популяций, изучаемые антропологией или классической генетикой, зависят не от одного, а от множества генов и их комбинаций и еще и от факторов среды (часто даже больше, чем от генов!), а факторы среды могут быть различны у различных популяций. Кроме того, изучаемые популяции могут быть неразличимы по выбранным или удобным фенотипическим маркерам, используемым при сравнении других попу-

ляций. При помощи молекулярных маркеров нахождение различий гарантировано вплоть до идентификации отдельной личности, а исследуемые маркеры различных человеческих популяций унифицированы.

3. Нейтральность анализируемых изменений генома. В филогеографических исследованиях обычно проводят анализ тех участков генома, которые не влекут за собой прямых приспособительных изменений у их носителей, т.е. не влияющих на выживаемость и способность оставлять потомство. В геноме человека участков, напрямую не связанных с кодированием важных метаболических функций, даже больше, чем тех участков, изменение которых может приводить к изменению приспособленности организма. Более того, в силу так называемой «вырожденности» генетического кода, даже в функционально важных генах возможны синонимические замены нуклеотидов, не приводящие к изменению функций кодируемых ими белков. Использование для идентификации популяций именно «нейтральных» изменений представляется наиболее логичным, поскольку именно такие изменения будут распространяться в популяции свободно, не подвергаясь действию иногда очень жесткого отбора, который не будет отмечать эти генетические изменения вместе с их носителями. С другой стороны, использование для анализа функциональных генов и их положительно и отрицательно влияющих на приспособленность мутаций также может многое рассказать об истории или прошлых условиях жизни той или иной популяции.

4. Относительно стабильная скорость мутационного процесса. Скорость нуклеотидных замен (вставок или выпадений) относительно одинакова, т.е. одно элементарное событие происходит в среднем за одно и то же количество лет, что позволяет рассчитывать время дивергенции популяций в поколениях или годах и, следовательно, вычислять время, когда две различные популяции были единым це-

лым. Таким образом, используя накопленные данные об изменчивости геномов людей, можно установить направление изменений, время дивергенции и время возникновения тех или иных популяций, получить дополнительные доказательства/опровержения тех или иных гипотез.

Из большого разнообразия полиморфных локусов генома человека, два занимают особое положение – митохондриальная ДНК (мтДНК) и Y-хромосома. В настоящее время они считаются уникальными инструментами генетиков в реконструкции истории популяций человека. МтДНК характеризуется следующими особенностями: наличие быстро эволюционирующего участка (гиперварибельный сегмент I или ГВСI), наследование по материнской линии, отсутствие рекомбинации. Малый эффективный популяционный размер этого локуса в сравнении с размером аутосом увеличивает его чувствительность к потоку генов и, следовательно, ведет к усилению различий между типами мтДНК в различных популяциях [13]. Y-хромосома, в свою очередь, обладает большим нерекombинирующим фрагментом, в котором к настоящему моменту идентифицировано огромное количество полиморфных сайтов. Для филогеографических исследований информативными являются медленно эволюционирующие однонуклеотидные замены, инсерции/делеции и быстро эволюционирующие микросателлиты [14, 15]. Разнообразие гаплогрупп мтДНК и Y-хромосомы и характерные для каждого этноса относительные их частоты распределения, наблюдаемые в современных популяциях, сформировались за счет последовательного возникновения спонтанных мутаций в этих локусах. Накопление мутаций происходило в течение длительного времени в процессе расселения, а также в результате основания каждой популяции относительно небольшим количеством людей и последующими миграционными процессами. Таким образом, оценивая весь пул изменчивости Y-хромосомы в современных по-

пуляциях человека, можно придти к первоначальному мужчине – «Адаму», а весь полиморфизм мтДНК в мировом масштабе, – ко всеобщей праматери – «Еве». Само сопоставление мутационной истории «мужских» и «женских» генов также дает немало интересной информации об истории этноса.

На основании разнообразия мтДНК современного человечества показано, что популяции различных географических регионов характеризуются специфическим набором типов мтДНК. Африканский континент, являющийся прародиной современного человека, представлен самым древним типом митохондриальной ДНК (гаплогруппы L1-L7) и их наибольшим разнообразием. Гаплогруппа L3 дала начало двум ветвям – M и N, потомки которых составляют пул мтДНК всех современных неафриканских популяций. Гаплогруппа N, в свою очередь, очень быстро дивергировала, давая начало ветви R. Таким образом, за небольшим исключением все потомки людей, населяющих Евразию, Америку, Австралию/Океанию происходят от трех «корневых» гаплогрупп – R, N, M [16, 17].

Всё разнообразие мтДНК современных европейских популяций представлено основными гаплогруппами R0 (включающая HV, H, V), JT, U, тремя минорными ветвями N1, N2 и X. Оценка возрастов коалесценции гаплогрупп мтДНК (время ответвления гаплогруппы/субгаплогруппы от наиболее близкого общего предка) и их региональное распределение позволили определить основные пути и временные рамки освоения человеком Европы [16, 17, 18]. Так, согласно данным по мтДНК, начало заселения Европы анатомически современным человеком датируется периодом около 60000-40000 лет до нашей эры. В последующем континент осваивался поэтапно в течение Верхнего Палеолита, давая начало новым ветвям мтДНК. Большое значение в формировании генетического портрета современных европейцев имел период ледникового максимума около

20000 лет до н.э. и связанные с ним эффекты основателя/дрейфа генов. Есть основания считать, что в это время европейская территория, пригодная для жизни, существенно сократилась, что неизбежно привело к резкому снижению количества людей и пространственной изоляции их групп. Территории Ближнего Востока и Северной Африки являются наиболее вероятными местами возникновения основных гаплогрупп мтДНК, распространенных в настоящее время в западной Евразии [18]. Принято, что миграции в эпоху Неолита внесли незначительный вклад в митохондриальный пул современных европейцев [18, 19], хотя этот вопрос требует дополнительных исследований [20].

Изучение мирового пула Y-хромосомы, а также его возрастная оценка показали сходную картину с таковой по мтДНК. Гаплогруппы, которые возникли в популяциях африканского континента, являются самыми древними – это A, B, а также, вероятнее всего, E и D. А многообразии гаплогрупп Y-хромосомы современных «неафриканских» популяций представлено ветвями трех вышедших из Африки гаплогрупп – C, D, E и макрогруппы F (которая включает оставшиеся ветви G-R) (YCC 2000). Согласно современным представлениям, освоение человеком новых земель после выхода из Африки проходило по «южному пути» [21, 22], когда древний евроазиатский тип/типы Y-хромосомы были привнесены в южную Азию, откуда и распространились в восточном, западном и северном направлениях. После начального заселения потомки людей на каждом из континентов, расселяясь, давали начало ветвям, специфичным для каждого региона. Кроме того, существовала вторая волна генов из Африки в западную Евразию, о чем свидетельствует наличие гаплогруппы E в генетическом пуле многих популяций Европы. Разнообразие Y-хромосомы у европейцев, как и в случае мтДНК, невелико и представлено в основном гаплогруппами R1a, R1b, I, N3 (70-80 % от общего числа гаплотипов).

Около 20 % приходится на гаплогруппы J2, E3b и G [21]. Суммируя вышесказанное, отметим, что изучение генетической истории человечества позволило уточнить, откорректировать и высказать новые сценарии доисторического периода жизни людей. Следует также указать на то, что получение такой информации было бы невозможным без исследований отдельных популяций, и последующего сопоставления данных. Однако и в настоящее время существуют популяции, недостаточно изученные в филогеографическом плане, генетический портрет которых требует уточнения и доработки. Одной из таких популяций являются белорусы. Исследования, направленные на изучение генетической структуры белорусов, изначально базировались на анализе классических генетических маркеров, а позднее – с привлечением молекулярных маркеров.

Следует отметить, что в плане этногеномики, белорусы практически не изучены. Те данные, которые имеются [23, 24, 25], не позволяют пока судить об особенностях формирования генетической структуры белорусов, определить основные пути миграций и их временные рамки,

а также положение белорусской популяции среди других европейских народов.

Целью настоящей работы явилось исследование генетической гетерогенности современных белорусов с использованием молекулярных маркеров мтДНК, Y-хромосомы и аутосомных маркеров. В задачи исследований входило создание ДНК-банка этнических белорусов, населяющих различные географические и историко-этнографические регионы нашей страны. В настоящей работе подводятся предварительные итоги исследования данного генного банка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор образцов

На основе анализа данных истории, археологии и этнографии на территории Беларуси были выделены шесть регионов, которые охватывают места древних поселений кривичей, радимичей и дреговичей (Рис.1) в каждом регионе были определены населенные пункты для экспедиционных выездов (Табл.1).



Рис.1. Карта Беларуси с отмеченными на ней пунктами сбора образцов

- ☆ Пункты сбора проб на территории древнего расселения кривичей
- Пункты сбора проб на территории древнего расселения радимичей
- Пункты сбора проб на территории древнего расселения дреговичей

Всего для сбора образцов крови было выполнено 18 выездов. Забор 5-10 мл венозной крови был произведен у добровольцев, здоровых, совершеннолетних мужчин, неродственников, проживающих в конкретном регионе в течение не менее трех поколений по отцовской и материнской линии. Для получения данной информации каждый пробанд был опрошен,

и данные внесены в его личную анкету. Выделение тотальной ДНК из лейкоцитов крови проводилось стандартным фенольно-хлороформным методом. В результате в генетический банк современных этнических белорусов включено около 900 образцов ДНК. Все исследования выполнены на материале этого ДНК банка.

Таблица 1

Регионы и населенные пункты сбора образцов

| Этногеографический регион | Пункты сбора образцов ДНК |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| Центральный (126 чел.) | Мир, Слуцк, Червень |
| Восточный (Поднепровье – 129 чел.) | Климовичи, Кричев, Славгород, Чечерск |
| Западное Полесье (158 чел.) | Кобрин, Лунинец, Береза |
| Восточное Полесье (128 чел.) | Лельчицы, Житковичи, Мозырь |
| Западный (Понеманье – 101 чел.) | Новогрудок, Ивье, Волковыск |
| Северный (Подвинье – 133 чел.) | Лужесно, Городок, Ула |

Секвенирование ГВС (Гипервариабельный сегмент) I и ПДРФ-анализ кодирующего региона митохондриальной ДНК (мтДНК)

Анализ полиморфизма мтДНК был выполнен на выборке из 292 образцов ДНК, включая представителей всех шести регионов Беларуси: 57 из Центрального региона, 57 из Северного, 45 из Восточного, 45 из Западного, 45 и 43 из Восточного и Западного Полесья, соответственно.

Фрагмент мтДНК, включающий контрольный регион между нуклеотидными позициями 16024-16400, был амплифицирован и секвенирован у всех образцов. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивались с уточненной Кембриджской последовательностью или rCRS (*revised Cambridge Referent Sequence*) [26]. Полиморфизм на участке 16180-16193, так называемый поли-Ц-тракт (*poly-C-tract*) (инсерции/делеции, однонуклеотидные замены) были исключены из анализа в силу очень высокой мутабельности этого региона. ПДРФ-анализ информативных позиций кодирующего региона

мтДНК (Табл. 2) с использованием соответствующих праймеров и рестриктаз был выполнен, как описано в литературе [27, 28, 29]. Все анализируемые образцы были классифицированы в соответствии с принятой классификацией [30, 31, 16, 18].

Генотипирование биаллельных маркеров и STR (Short Tandem Repeat)-локусов Y-хромосомы

В соответствии с общепринятой схемой классификации гаплогрупп Y-хромосомы (YCC – Y Chromosome Consortium 2002) [32], 574 образца тотальной ДНК были генотипированы с использованием 25 биаллельных маркеров, информативных для популяции белорусов: M9, SRY₁₅₃₂ [33], 92R7 [34], Tat [35], M231, M269, M170, M172, M35, M78, M174, M89, M173, [14], M253 [36], P37 [32], 12f2 [37] вместе с SRY₁₅₋₁₆, M70, M201, M223, M73, M22, M124, M130 [14], M242 [36], YAP [38]. Полиморфное состояние аллелей определялось методом ПЦР-ПДРФ анализа с соответствующим ферментом рестрикции или методом прямого секвенирования фрагмента ДНК, содержащего по-

лиморфизм. Маркер SRY₁₅₃₂, определяющий гаплогруппу R1a, был генотипирован на всей выборке, исходя из предположения, что данная гаплогруппа будет доминирующей в пуле Y-хромосомы белорусов.

Таблица 2

Проанализированные полиморфные позиции мтДНК, информативные для основных гаплогрупп мтДНК Евразии

| Гаплогруппа | Полиморфный сайт | ПДРФ-сайт |
|----------------|------------------|-----------------|
| H | 73 G A | - 73 Alw44I |
| H | 14766 T C | - 14766 TruII |
| H | 7028 C T | - 7025 AluI |
| J1, H1 | 3010 G A | - 3007 Bsh1236I |
| H13 | 4745 A G | + 4745 Scal |
| H2 | 4769 G A | + 4769 AluI |
| H7 | 4793 A G | + 4793 BsuRI |
| H4 | 5004 T C | - 5003 DdeI |
| H11 | 8448 T C | - 8446 SspI |
| H6 | 16482 A G | + 16478 DdeI |
| U | 12308 A G | + 12308 HinfI |
| U4 | 4646 T C | + 4643 RsaI |
| V | 4580 G A | - 4577 NlaIII |
| J,I,N1a,L,M,K1 | 10398 A G | + 10394 DdeI |
| T1 | 12633 C T | - 12629 Eco47I |
| R | 12705 C T | +12704 MboII |
| R | 14766 T C | + 14766 TruII |
| N | 12705 C T | -12704 MboII |
| N1, I | 12501 G A | - 12498 NlaIII |
| I | 10034 T C | + 10032 AluI |
| X | 14470TC | + 14465 BstI107 |
| W | 8994 G A | - 8994 BsuRI |
| D | 4883 C T | - 4883 BccI |
| C,Z | 8584 G A | - 8581 Sat I |
| M | 10400 C T | +10397 AluI |
| M10 | 10646 G A | + 10646 Rsa |
| H5 | 456 C T | секвенирование |
| H3 | 6776 T C | секвенирование |
| H10 | 14470 T C | секвенирование |

Примечание: номера нуклеотидных позиций в таблице (73, 14766 и т.д.) указаны по отношению к rCRS (Andrews et al., 1999); +/- указывают на наличие/отсутствие сайта рестрикции; "секвенирование" означает, что полиморфное состояние аллели было определено методом прямого секвенирования.

Анализ остальных маркеров был проведен в иерархичном порядке, следуя схеме YCC 2002 и, начиная с маркера M9.

Дополнительно был проанализирован полиморфизм семи микросателлитных локусов Y-хромосомы (минимальный европейский генотип): DYS391, DYS389I, DYS389II, DYS393, DYS390, DYS19, DYS392 [39]. Для определения размера аллелей проводилась амплификация фрагментов ДНК, включающих микросателлиты, и последующее их секвенирование. В качестве “леддеров” использовались стандарты с уже известной структурой тандемного повтора.

Построение филогенетического древа

Филогенетическое древо, отражающее иерархическую связь между гаплогруппами мтДНК в белорусской популяции, было построено с использованием программы NetViz 3D Educational 6.5 с соблюдением принципа “наибольшей экономии” (*maximum parsimony*) [40]. Тот же принцип был соблюден при объединении выявленных гаплогрупп/гаплотипов Y-хромосомы в общую филогенетическую систему.

Определение относительного возраста гаплогрупп мтДНК и Y-хромосомы

Оценка возраста гаплогрупп Y-хромосомы проводилась по данным разнообразия микросателлитов в каждой гаплогруппе. Средний уровень изменчивости микросателлитов был взят по L. Zhivotovsky как 0,00069 на один локус за одно поколение (25 лет) [41]. Возраст гаплогрупп определяли как средний квадрат разницы числа повторов в микросателлитах среди всех образцов, принадлежащих к анализируемой гаплогруппе и “модальным гаплотипом”, разделенные на указанный выше уровень мутаций. Время коалесценции гаплогрупп мтДНК (примерный возраст отделения определенной гаплогруппы/субгаплогруппы) оценивалось на основании полученного филогенетического

древа как количество транзиций от основного (*root haplotype – rho-ρ*) гаплотипа. Одна транзитивная замена в контрольном регионе между парами 16090-16365 принималась равной 20180 лет [42; 43 Watson et al., 1997]. Стандартное отклонение для полученных данных определялось как в работе Saillard и др. [44].

Анализ полиморфизма аутосом

Исследование полиморфизма аутосомных генов *ACE*, *AGT*, *eNOS*, *LPL* и *apoE* было проведено методом полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами на белорусской популяции, в состав которой входили более 700 индивидумов из разных регионов Беларуси. Последовательности праймеров, использованных в ходе ПЦР, были заимствованы из ранее опубликованных работ [45, 46, 47, 48, 49]. Условия генотипирования полиморфных аллелей пяти исследуемых генов представлены в таблице 3.

При изучении генов *AGT*, *LPL* и *apoE* был использован метод ПДРФ с помощью эндонуклеаз *NcoI*, *HindIII*, *HhaI* соответственно (Табл. 3). Определение генотипов аутосомных генов проводилось электрофоретическим разделением фрагментов амплификации и/или рестрикции в полиакриламидном (*AGT*, *eNOS*, *apoE*) и агарозном (*ACE* и *LPL*) гелях.

Статистический анализ

Были определены частоты гаплогрупп/субгаплогрупп мтДНК и Y-хромосомы в популяции белорусов в целом и в отдельных субпопуляциях шести регионов. Статистическая значимость различий частот гаплогрупп между регионами оценивалась методом χ -квадрат.

Статистическая обработка данных по аутосомным молекулярным маркерам проводилась с помощью специализированного пакета анализа данных Microsoft Excel и программы Statistica 6.0.

Таблица 3

Условия генотипирования полиморфных аллелей исследуемых генов

| Ген | Полиморфизм | Температура отжига праймеров | Размер фрагмента ПЦР, п.н. | Рестриктаза | Длины рестриктных фрагментов, п.н. |
|-----------------------|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| <i>ACE</i> (17q23) | <i>Alu</i> -инсерция 287 п.н. | 580С | 200 (аллель D) 487 (аллель I) | - | - |
| <i>AGT</i> (1q42-q43) | <i>T174M</i> | 600С | 303 (аллель T) | <i>NcoI</i> | 197 + 106 (аллель M) |
| <i>eNOS</i> (7q36) | минисателлит (27 п.н.) | 580С | 420 (аллель a) 393 (аллель b) | - | - |
| <i>LPL</i> (8p22) | <i>Ser447Stop</i> | 560С | 137 (аллель C) | <i>HinfI</i> | 113 + 24 (аллель G) |
| <i>ApoE</i> (19q13.2) | <i>Cys112Arg</i> <i>Arg158Cys</i> | 600С | 250 | <i>HhaI</i> | Специфичны для ε2, ε3, ε4 аллелей |

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальная ДНК белорусов

Секвенирование гипервариабельного сегмента (ГВС1) мтДНК и анализ 28 диагностических позиций кодирующего региона на выборке из 292 образцов коренных жителей шести различных регионов страны позволил выявить 198 гаплотипов. Эти гаплотипы, в соответствии с существующей классификацией [27, 30, 31, 16, 50] сгруппированы в 44 гаплогруппы/гаплотипа. Более 95 % выявленного разнообразия гаплогрупп происходят от макрогруппы N и относятся к западному варианту евроазиатского типа мтДНК, в то время как доля восточного варианта составляет не более 5 % в проанализированной выборке [51]. Выявленные гаплогруппы/субгаплогруппы, их частоты в популяции белорусов в целом, а также распределение частот среди субпопуляций приведены в таблице 4. Филогенетическое древо митохондриальных гаплогрупп отражено на рисунке 2.

Анализ распределения гаплогрупп мтДНК среди субпопуляций шести регионов Беларуси выявил некоторую неоднородность. Митохондриальный тип

каждой из субпопуляций представлен как минимум пятью основными гаплогруппами H, U, J, T, V (Табл. 4). Частоты преобладающей гаплогруппы H варьируют от максимальной 45 % (в центральном регионе) до минимальной 30 % (в Западном Полесье), хотя эти различия статистически недостоверны. Для гаплогруппы U отмечена статистически значимая разница в распределении: от 30 % (95 %, доверительный интервал 21-48 %) в Поднепровье до 8 % (95 %, 3,6-20 %) в Восточном Полесье. Также неравномерным является и распределение гаплогруппы J. Максимальная частота в Подвинье составляет 15,7 % (95 %, 8,6-27,4 %), минимальная – 2 % (95 %, 0,5-11,5 %) в Восточном Полесье. Кроме того, Восточное Полесье отличается и по показателям частот двух других гаплогрупп: V и T – по 15 % каждая (для других субпопуляций частоты значительно ниже – от 3 % до 8 %).

Другие гаплогруппы (N, I, W, X, C, M, G, D) имеют относительно низкие частоты, что делает невозможным определение какой-либо закономерности в их распределении среди белорусских субпопуляций.

Таблица 4

Гаплогруппы мтДНК и их частоты в популяции белорусов

| Гаплогруппа | В субпопуляциях | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|-----------------|------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| | Всего | | Ц | | С | | В | | ВП | | ЗП | | З | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| HV | 9 | 3,08 | 4 | 7,02 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,22 | 4 | 9,30 | | 0,00 |
| HV0a (preV2) | 2 | 0,68 | 2 | 3,51 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 |
| HV0 (preV1) | 2 | 0,68 | 1 | 1,75 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,33 | | 0,00 |
| V | 18 | 6,16 | 2 | 3,51 | 1 | 1,75 | 3 | 6,67 | 7 | 15,56 | 1 | 2,33 | 4 | 8,89 |
| U5 | 2 | 0,68 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,33 | 1 | 2,22 |
| U5a | 19 | 6,5 | 5 | 8,77 | 4 | 7,02 | 5 | 11,11 | 1 | 2,22 | 2 | 4,65 | 2 | 4,44 |
| U5b | 11 | 4,79 | 2 | 3,51 | 2 | 3,51 | 3 | 6,67 | 1 | 2,22 | 1 | 2,33 | 2 | 4,44 |
| U4 | 10 | 3,42 | 1 | 1,75 | 3 | 5,26 | 2 | 4,44 | | 0,00 | 2 | 4,65 | 2 | 4,44 |
| U3 | 6 | 2,05 | 1 | 1,75 | | 0,00 | | 0,00 | 2 | 4,44 | 3 | 6,98 | | 0,00 |
| U2e | 4 | 1,36 | | 0,00 | | 0,00 | 3 | 6,67 | | 0,00 | 1 | 2,33 | | 0,00 |
| U* | 5 | 1,71 | | 0,00 | 1 | 1,75 | 2 | 4,44 | | 0,00 | | 0,00 | 2 | 4,44 |
| U7 | 1 | 0,34 | 1 | 1,75 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 |
| U8b | 1 | 0,34 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,22 |
| K1 | 8 | 2,73 | | 0,00 | 2 | 3,51 | | 0,00 | 3 | 6,67 | 3 | 6,98 | | 0,00 |
| K2 | 2 | 0,68 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,22 | | 0,00 | 1 | 2,33 | | 0,00 |
| T1 | 4 | 1,36 | 1 | 1,75 | | 0,00 | | 0,00 | 2 | 4,44 | | 0,00 | 1 | 2,22 |
| T2 | 4 | 1,36 | | 0,00 | 1 | 1,75 | | 0,00 | 1 | 2,22 | 1 | 2,33 | 1 | 2,22 |
| T2a | 13 | 4,45 | | 0,00 | 4 | 7,02 | 1 | 2,22 | 4 | 8,89 | 1 | 2,33 | 3 | 6,67 |
| T2c | 1 | 0,34 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,33 | | 0,00 |
| J1 | 24 | 8,21 | 4 | 7,02 | 9 | 15,79 | 4 | 8,89 | 1 | 2,22 | 2 | 4,65 | 4 | 8,89 |
| J2 | 3 | 1,02 | 2 | 3,51 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,22 |
| N* | 1 | 0,34 | | 0,00 | 1 | 1,75 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 |
| N1 | 2 | 0,68 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,22 | 1 | 2,33 | | 0,00 |
| N1a | 2 | 0,68 | 2 | 3,51 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 |
| N1b | 4 | 1,36 | 2 | 3,51 | | 0,00 | 1 | 2,22 | 1 | 2,22 | | 0,00 | | 0,00 |
| I | 7 | 2,39 | | 0,00 | 1 | 1,75 | 2 | 4,44 | 1 | 2,22 | 2 | 4,65 | 1 | 2,22 |
| W | 9 | 3,08 | 1 | 1,75 | 3 | 5,26 | 3 | 6,67 | | 0,00 | | 0,00 | 2 | 4,44 |
| X | 3 | 1,02 | | 0,00 | 1 | 1,75 | | 0,00 | 1 | 2,22 | | 0,00 | 1 | 2,22 |
| M10 | 2 | 0,68 | | 0,00 | 3 | 5,26 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 |
| C | 3 | 1,02 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,22 | | 0,00 | 1 | 2,33 | | 0,00 |
| G | 1 | 0,34 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,22 |
| D4b | 1 | 0,34 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,33 | | 0,00 |
| H1 | 19 | 6,5 | 2 | 3,51 | 4 | 7,02 | 2 | 4,44 | 3 | 6,67 | 6 | 13,95 | 2 | 4,44 |
| H1a | 3 | 1,02 | 2 | 3,51 | | 0,00 | 1 | 2,22 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 |
| H1b | 11 | 3,76 | 2 | 3,51 | 4 | 7,02 | 3 | 6,67 | | 0,00 | | 0,00 | 2 | 4,44 |
| H2 | 7 | 2,39 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,22 | 4 | 8,89 | 1 | 2,33 | 1 | 2,22 |
| H2a1 | 6 | 2,05 | 1 | 1,75 | 1 | 1,75 | 2 | 4,44 | 1 | 2,22 | | 0,00 | 1 | 2,22 |
| H6 | 7 | 2,39 | 3 | 5,26 | 2 | 3,51 | | 0,00 | | 0,00 | 1 | 2,33 | 1 | 2,22 |
| H5 | 8 | 2,73 | 3 | 5,26 | | 0,00 | | 0,00 | 3 | 6,67 | | 0,00 | 2 | 4,44 |
| H11a | 4 | 1,36 | 1 | 1,75 | 1 | 1,75 | 1 | 2,22 | 1 | 2,22 | | 0,00 | | 0,00 |
| H4 | 1 | 0,34 | | 0,00 | 1 | 1,75 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 |
| H13a1 | 1 | 0,34 | 1 | 1,75 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 |
| H10 | 1 | 0,34 | 1 | 1,75 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 | | 0,00 |
| H* | 40 | 13,69 | 10 | 17,54 | 8 | 14,04 | 4 | 8,89 | 6 | 13,33 | 5 | 11,63 | 7 | 15,56 |
| Всего | 292 | 100 | 57 | | 57 | | 45 | | 45 | | 43 | | 45 | |

Примечание: “гаплогруппа/суб-” – обозначает гаплогруппу/субгаплогруппу мтДНК; регионы обозначены как: Ц – Центральный, С – Северный; В – Восточный, ВП – Восточное Полесье, ЗП – Западное Полесье, З – Западный

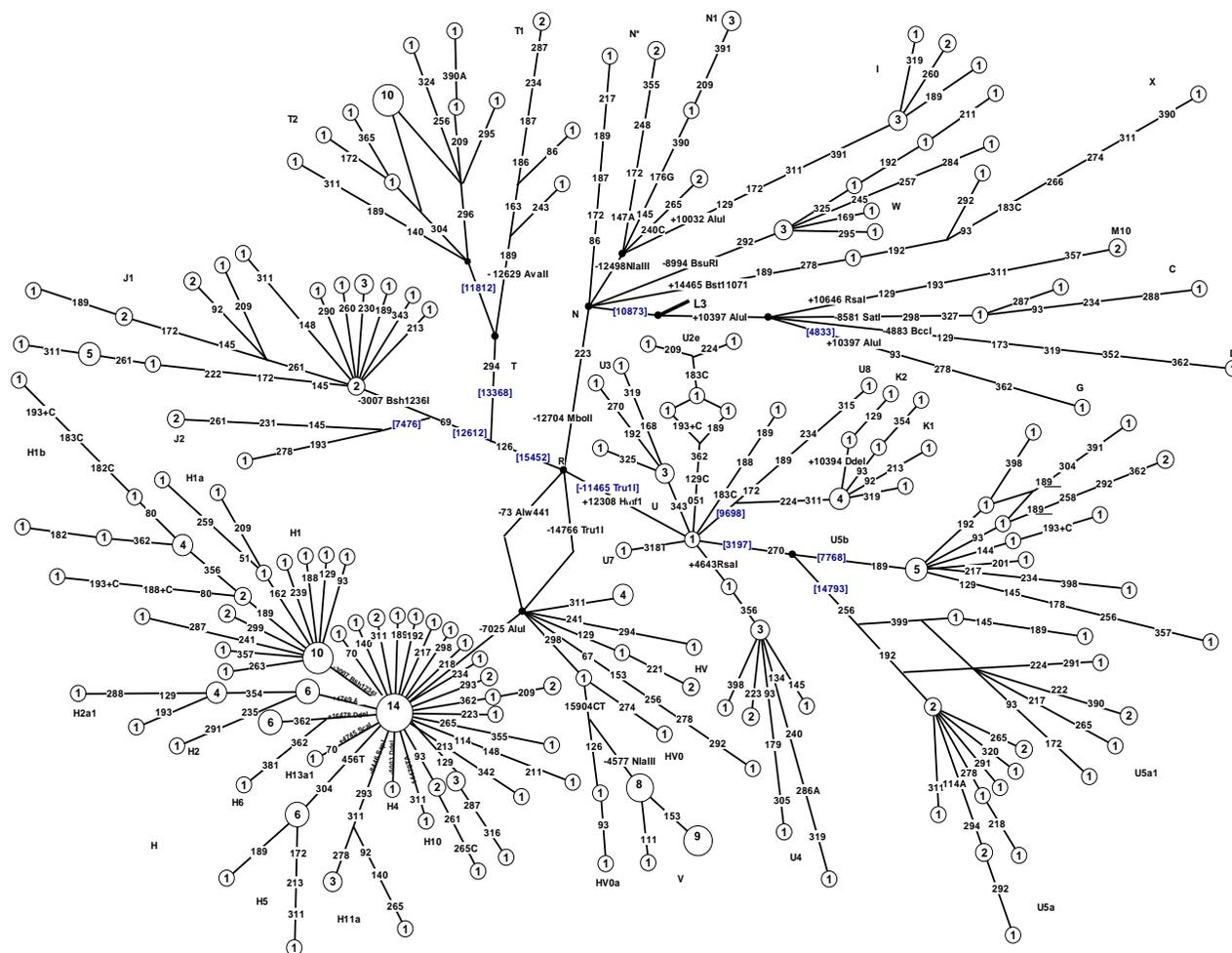


Рис.2. Филогенетическое древо мтДНК-потомков в белорусской популяции, построенное на основании последовательностей ГВС I и полиморфных позиций кодирующего региона мтДНК.

Диаметр окружностей пропорционален частоте гаплотипа, полиморфные позиции ГВС I указаны относительно rCRS минус 16000 [26], нуклеотидные замены обозначены суффиксом только в случае трансверсии, +/- обозначают наличие/потерю сайта рестрикции в кодирующем регионе, полиморфные позиции в квадратных скобках приведены дополнительно с целью увеличения разрешения филогении древа мтДНК.

В проанализированной выборке уровень генного разнообразия (H) составил 0,97. Данные индексы варьируют незначительно среди субпопуляций – от максимального в восточном регионе (0,99) до минимального в западном Полесье (0,94), в целом указывая на относительную гомогенность неизолированной популяции белорусов. Индекс нуклеотидного разнообразия в среднем по анализируемой выборке составил 0,013. Следует отметить незначительную разницу этого показателя по регионам. Анализ молекулярной вариации показал, что генетическое разнообразие в популяции белорусов в основном обусловлено различием в субпопуляциях внутри каждой группы (99,5 %), процент разнообразия между группами – менее 0,5 %.

Из шести изученных субпопуляций Западного Полесье представлено наибольшим разнообразием митохондриальных гаплогрупп (12 гаплогрупп/гаплотипов из 17 найденных), а наименьшим – Понема-

нье (9 гаплогрупп/гаплотипов из 17) (Табл. 4). Следует отметить, что по данным палеогеологии [3] и археологии Беларуси [2], заселение проходило с Юго-Западной части современной территории Беларуси (Западное Полесье), в которой раньше, чем в других частях, произошло освобождение от ледника, и раньше началось возделывание пшеницы и ржи.

Следовательно, наибольшее разнообразие мтДНК может быть отражением более раннего заселения этого региона по сравнению с остальной территорией. Данные по распределению гаплогрупп мтДНК в некоторых европейских популяциях приведены в таблице 5. Сопоставление частот митохондриальных гаплогрупп указывает на высокий уровень сходства и, тем самым, на общность предков по материнской линии.

Таблица 5

Частоты гаплогрупп мтДНК в некоторых европейских популяциях

| Популяция | N* | Гаплогруппа, % | | | | | | | | | | Другие | |
|-----------|-----|----------------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|--------|--|
| | | V | H | J | T | U | K | I | W | X | | | |
| Белорусы | 292 | 6,16 | 36,90 | 9,20 | 7,50 | 20,20 | 3,40 | 2,39 | 2,73 | 1,02 | 9,70 | [51] | |
| Русские | 436 | 5,47 | 42,29 | 7,96 | 10,95 | 17,47 | 2,99 | 2,49 | 1,99 | 3,48 | 4,48 | [52] | |
| Поляки | 201 | 4,80 | 45,18 | 7,80 | 11,46 | 16,07 | 3,44 | 1,83 | 3,67 | 1,83 | 3,90 | [52] | |
| Хорваты | 721 | 5,10 | 41,10 | 9,70 | 7,36 | 13,98 | 5,10 | 3,20 | 3,30 | 1,10 | 5,46 | [53] | |
| Словаки | 382 | 2,88 | 42,40 | 8,38 | 8,90 | 21,20 | 4,97 | 2,09 | 1,57 | 0,10 | 4,74 | [54] | |
| Литовцы | 180 | 5,00 | 46,10 | 7,80 | 10,00 | 18,40 | 2,80 | 3,90 | 1,10 | 1,10 | 4,60 | [55] | |
| Латыши | 299 | 3,00 | 44,50 | 6,40 | 9,40 | 23,10 | 2,30 | 4,30 | 4,00 | 0,30 | 2,70 | [56] | |
| Украинцы | 129 | 6,84 | 31,16 | 10,64 | 9,12 | 16,72 | 4,56 | 1,52 | 0,76 | 0,76 | 6,08 | ** | |
| Чехи | 94 | 2,10 | 40,40 | 9,60 | 14,90 | 20,20 | 4,30 | 1,00 | 0,00 | 2,10 | 5,30 | ** | |
| Венгры | 116 | 2,58 | 40,52 | 7,74 | 11,18 | 17,20 | 4,30 | 1,72 | 4,30 | 0,86 | 9,46 | ** | |
| Немцы | 333 | 4,50 | 47,70 | 8,40 | 9,00 | 13,50 | 7,50 | 1,80 | 2,70 | 1,20 | 4,20 | [57] | |
| Финны | 580 | 6,60 | 40,50 | 4,80 | 3,80 | 25,00 | 2,90 | 4,10 | 8,80 | 0,90 | 3,40 | [58] | |
| Испанцы | 118 | 4,20 | 47,50 | 13,00 | 3,40 | 16,10 | 5,10 | 1,70 | 1,70 | 4,20 | 4,80 | [59] | |

Примечания N* - количество образцов, ** - данные взяты из базы данных Эстонского Биоцентра, Др. – другие

Высокая частота гаплогруппы H отмечена как для популяций Восточной Европы (русские, украинцы), так и для западной и южной части Европы (Табл. 5). Частота гаплогруппы U (20 %) в белорус-

ской популяции несколько выше по сравнению с украинцами и русскими (16 % и 17 %, соответственно) и в то же время сближает белорусов с западными славянами – чехами и словаками. Относительно

высокий процент гаплогруппы V отмечен для трех из тринадцати анализируемых популяций – белорусов, украинцев и финнов (чуть более 6 %).

Частота гаплогруппы J у белорусов близка к таковой у хорватов, украинцев и чехов, в то время как она ниже у русских, поляков и соседствующих на севере – латышей и литовцев. Также по частоте гаплогруппы T – 7-8 % белорусы ближе к хорватам и словакам, чем к русским, полякам и балтам (9 %-10 %).

Для того, чтобы найти родство белорусов с другими европейцами по материнской линии, был выполнен анализ главных компонент (principle component analysis – PCA). В анализ было взято 13 популяций (Табл. 5), включающих представителей

западных, восточных, южных славян, жителей северной и западной Европы (всего 3881 образец мтДНК) и частоты основных гаплогрупп мтДНК.

Полученная РС-диаграмма показана на рисунке 3. Изменчивость для первой компоненты составляет 40,3 %, что обусловлено в основном различиями в частотах гаплогрупп U, I, V, H, K, J. Вторая компонента насчитывает 20 % генетического разнообразия и обусловлена в частности вариацией частот гаплогрупп W, T и X. Из полученной картины распределения популяций видно, что белорусы попадают в один кластер с россиянами, хорватами, венграми, поляками, литовцами, словаками, украинцами и германцами.

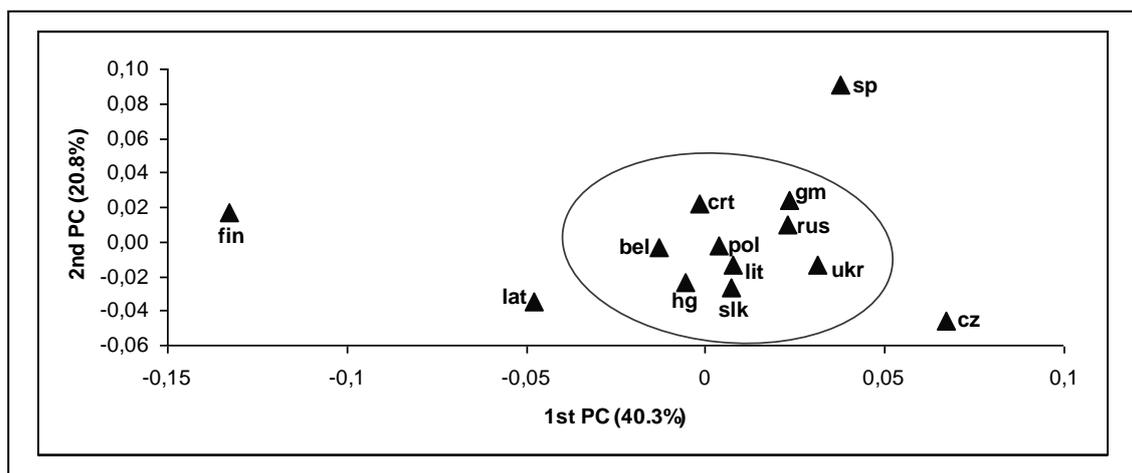


Рис. 3. PCA – диаграмма основанная на частотах гаплогрупп мтДНК в некоторых европейских популяциях

Популяции обозначены как: белорусы – bel, хорваты – crt, чехи – cz, финны – fin, немцы – gm, венгры – hg, латыши – lat, литовцы – lit, поляки – pol, русские – rus, словаки – slk, испанцы – sp, украинцы – ukr. Генетическая изменчивость для каждой из компонент (1st, 2nd PC) приведена в скобках (%). В окружность объединены популяции, образующие тесный кластер.

Отдельно на данном плоте стоят финны, латыши, чехи и испанцы, что обусловлено разницей в частотах W, T и X, соответственно. Образец кластеризации популяций свидетельствует об отсутствии четкой границы между европейскими популяциями и свидетельствует об их генеалогическом родстве по материнской линии.

Время коалесценции – т.е. время отщепления гаплогруппы /субгаплогруппы от наиболее генеалогически близкого об-

щего предка (TMRCA – The Most Recent Common Ancestor) гаплогрупп мтДНК – приведено в таблице 6.

Наиболее распространенная в белорусской популяции гаплогруппа H имеет ярко выраженную звездообразную филогению (“star-like”) и время коалесценции 20200+/-3100 лет. Для внутренних ветвей H–H1, H2 и H5 возраст составил 22000+/-6400 лет, 17100+/-7400 лет и 10100+/-5000 лет, соответственно. Для гаплогруппы U и

её субгрупп возраст *TMRCА* датируется периодом 38000–60000 лет до н.э. Из всех U-субгрупп самой молодой является К (14100 +/- 5300 лет). Для субгрупп макрогаплогруппы М и N также установлен воз-

раст, который превышает 50000 лет (N, X, M10, C). Возраст ветви JT датируется периодом 46000-53000 лет до н.э. Возраст коалесценции гаплогруппы V составил 11200 лет.

Таблица 6

Время коалесценции митохондриальных гаплогрупп / субгаплогрупп в популяции белорусов

| Гп | n | $\rho \pm \sigma$ | $P / n\sigma^2$ (k14) | ρ / σ^2 (k13) | Возраст (лет) |
|-----|-----|-------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------|
| H | 108 | 1,000 +/- 0,152 | 0,400 | 43,200 | 20200 +/- 3100 |
| H1 | 33 | 1,091 +/- 0,318 | 0,327 | 10,080 | 22000 +/- 6400 |
| H2 | 13 | 0,846 +/- 0,369 | 0,478 | 6,217 | 17100 +/- 7400 |
| H5 | 8 | 0,500 +/- 0,250 | 1,000 | 8,000 | 10100 +/- 5000 |
| V | 18 | 0,556 +/- 0,503 | 0,122 | 2,195 | 11200 +/- 10200 |
| U | 59 | 2,542 +/- 0,254 | 0,670 | 36,510 | 51300 +/- 5100 |
| U5 | 35 | 32,857 +/- 0,345 | 0,685 | 23,973 | 57700 +/- 7000 |
| U5a | 19 | 2,368 +/- 0,404 | 0,723 | 14,492 | 47800 +/- 8200 |
| U5b | 14 | 3,000 +/- 0,735 | 0,556 | 5,556 | 60500 +/- 14800 |
| U4 | 10 | 1,900 +/- 0,592 | 0,543 | 5,429 | 38300 +/- 11900 |
| K | 10 | 0,700 +/- 0,265 | 1,000 | 10,000 | 14100 +/- 5300 |
| J | 27 | 2,296 +/- 0,474 | 0,378 | 10,207 | 46300 +/- 9600 |
| J2 | 3 | 2,667 +/- 1,247 | 0,571 | 1,714 | 53800 +/- 25200 |
| J1 | 24 | 2,250 +/- 0,510 | 0,360 | 8,640 | 45400 +/- 10300 |
| T | 22 | 2,455 +/- 0,713 | 0,220 | 4,829 | 49500 +/- 14400 |
| M10 | 2 | 4,000 +/- 2,000 | 0,500 | 1,000 | 80700 +/- 40400 |
| C | 3 | 3,333 +/- 1,054 | 1,000 | 3,000 | 67300 +/- 21300 |
| I | 7 | 0,571 +/- 0,350 | 0,667 | 4,667 | 11150 +/- 7100 |
| W | 9 | 1,222 +/- 0,369 | 1,000 | 9,000 | 24700 +/- 74000 |
| X | 3 | 2,000 +/- 0,816 | 1,000 | 3,000 | 40400 +/- 16500 |
| N | 9 | 3,000 +/- 0,839 | 0,474 | 4,263 | 60500 +/- 16900 |

Примечания N – количество образцов в анализируемой гаплогруппе/субгаплогруппе, Гп – гаплогруппа, ρ – среднее транзитивное расстояние от базового гаплотипа (“root haplotype”), $\rho / n\sigma^2$ – эффективность расчета времени коалесценции, ρ / σ^2 – эффективный “star size”.

Полученные возрасты гаплогрупп мтДНК в белорусской популяции согласуются с опубликованными данными по гаплогруппам в других популяциях [18, 27, 60], но в большинстве случаев имеют высокую стандартную ошибку, что может быть обусловлено малым количеством образцов, анализируемых в каждой гаплогруппе.

Анализ распределения частот гаплогрупп мтДНК и возрастов коалесценции среди популяций Европы позволяет обозначить основные источники формирования пула мтДНК у белорусов. H-кластер является доминирующим, и представлен наибольшим разнообразием субгаплог-

рупп в изученной выборке: H1, H2, H4, H5, H6, H10, H13. Гаплогруппа H является одной из самых распространенных в европейских популяциях, кроме того, встречается с высокой частотой в северной Африке, на Ближнем Востоке, в центральной и южной Азии. Её филогения изучена к настоящему моменту достаточно подробно [50, 61, 62]. На основании полного секвенирования митохондриального генома у представителей гаплогруппы H было показано, что она представлена многочисленными субгаплогруппами (около 14), которые имеют различное происхождение и географическое распространение [62]. Так, преобладающие в белорусской популяции

субгаплогруппы H1 и H2 “маркируют” два различных генетических потока: H1 – с юго-западной (территория современной Испании) и H2 – юго-восточной части Европы (территория Прикаспия). Гаплогруппы H6 и H5, вероятнее всего, были привнесены в митохондриальный пул белорусов миграционными потоками из Ближнего Востока и Центральной Азии.

Гаплогруппа V, сестринская ветвь по отношению к H, является относительно молодой и типично европейской. Наиболее вероятным местом её возникновения является территория современных Пиреней, откуда данный тип мтДНК распространился в северном, восточном и южном направлениях. Гаплогруппа V имеет в настоящее время высокие частоты в популяциях юго-западной, западной и северной Европы [30].

Гаплогруппа U, вторая доминирующая в белорусской популяции, представлена субгаплогруппами U5, U4, U3, U2, U7, U8. Показана высокая частота гаплогруппы U в популяциях Европы, на Ближнем Востоке, в Индии, а также в регионе суб-Сахары [18]. Филогенетический анализ и внутренняя кластеризация очень древней гаплогруппы U свидетельствуют о том, что наблюдаемое распределение её субгрупп является результатом их вторичной экспансии в ранний послеледниковый период. Субгаплогруппа U5 имеет высокую частоту на севере Европы (саамы), на северо-западе Африки, в волго-уральском регионе России, а также преобладает среди других U-субгрупп в европейских популяциях. Предполагают, что экспансия этой ветви происходила за счет нескольких миграционных событий либо из континентальной Европы, либо из Волго-Уральского региона [63, 64]. Гаплогруппа U4 была привнесена в восточную Европу из юго-восточного ледникового убежища (территория Прикаспия). Для U2 и U3 отмечены высокие частоты в регионе Кавказа и дальнейшее их уменьшение в направлении севера, запада и юга. Гаплогруппы U7 и U8 являются минорными, тем не

менее, их присутствие является отражением генетических потоков из юго-западной Европы и южной Азии, соответственно. Гаплогруппа K, доминирующая у евреев Ашкенази, в целом имеет низкую частоту в популяциях Европы и Ближнего Востока [65].

Ближний Восток является местом возникновения двух сестринских гаплогрупп J и T, что датируется около 50000 лет назад. В европейских популяциях данные гаплогруппы возникли позднее, вероятнее всего, это период послеледниковой экспансии [18]. Следует отметить, что эти гаплогруппы имеют сравнительно низкую частоту в европейских популяциях, но при этом широкую географию распространения; гаплогруппа J имеет максимум в Аравии. Региональный анализ ветвей N1, W, I и X в западной Евразии и их возрастная оценка показали, что эти гаплогруппы были привнесены в Европу до последнего ледникового максимума. Однако, в дальнейшем снижение размера популяции в результате ухудшения климатических условий неизбежно привело к уменьшению разнообразия этих гаплогрупп и последующей их реэксансии после отступления ледника [18]. В распространении этих гаплогрупп большое значение имели миграции в эпоху Неолита.

Азиатский компонент митохондриального пула белорусов представлен ветвями макрогруппы M: M10, C, G, D4b и вместе они составляют около 2%. Примечательным является то, что для многих популяций восточной Европы, в том числе и балтов, характерно присутствие азиатских гаплогрупп, хотя и в незначительном количестве [52, 55, 56].

В целом, анализ мтДНК белорусов свидетельствует о том, что предки современных белорусов, так же как и большинство народов, населяющих Европу, происходят по материнской линии из единой индоевропейской семьи. В этом смысле, во времена ледникового максимума (20000 лет тому назад) праматери славян, германцев и балтов и других индоевропейцев бы-

ли общими. Вместе с тем частотные характеристики гаплогрупп среди коренного белорусского населения позволяют охарактеризовать происхождение белорусов, главным образом, от славянских племен, имеющих, возможно, уже в историческое время некоторые особенности, которые сохранились до настоящего времени. Так же как и другие славянские народы, белорусский этнос в генетическом смысле сформировался на основе праславянских/славянских племен, существовавших на территории Беларуси. Полученные к настоящему моменту данные не позволяют вывести происхождение белорусов непосредственно ни от других славянских народов (поляков и русских), ни от балтов. Более того, возможно, предки белорусов внесли вклад в становление других славянских народов – великорусского – расселяясь в северо-восточном направлении и балканских славян, расселяясь в юго-западном направлении, о чем свидетельствует не только генетическое сходство по мтДНК, но исторические источники [2]

Разнообразие Y-хромосомы в белорусской популяции

Полиморфизм Y-хромосомы в белорусской популяции был изучен посредством генотипирования 25 биаллельных маркеров и 7 микросателлитных локусов на выборке из 574 этнических белорусов. Установлено, что разнообразие пула Y-хромосомы представлено следующим набором гаплогрупп/субгаплогрупп: E*, E3b, E3b1, F*, G*, I*, I1a, I1b, I1c, J*, J2, K*, K2, P*, N*, N3, Q*, R*, R1*, R1a, R1b3, R1b4. Львиная доля компонентов пула Y-хромосомы белорусов, так же как и мтДНК, представлена типом, характерным для западной Евразии. Три субгаплогруппы – R1a, I1b и N3 – занимают доминирующее положение, что является особенностью популяций восточной Европы славянской и неславянской языковой группы. Их общая частота составляет около 76% всего разнообразия Y-хромосомы.

На рис. 4 схематично отображено древо биаллельных гаплогрупп Y-хромосомы: (А)–схема Y-гаплогрупп и определяющие их маркеры и (Б)–древу, построенное по данным частот в белорусской популяции.

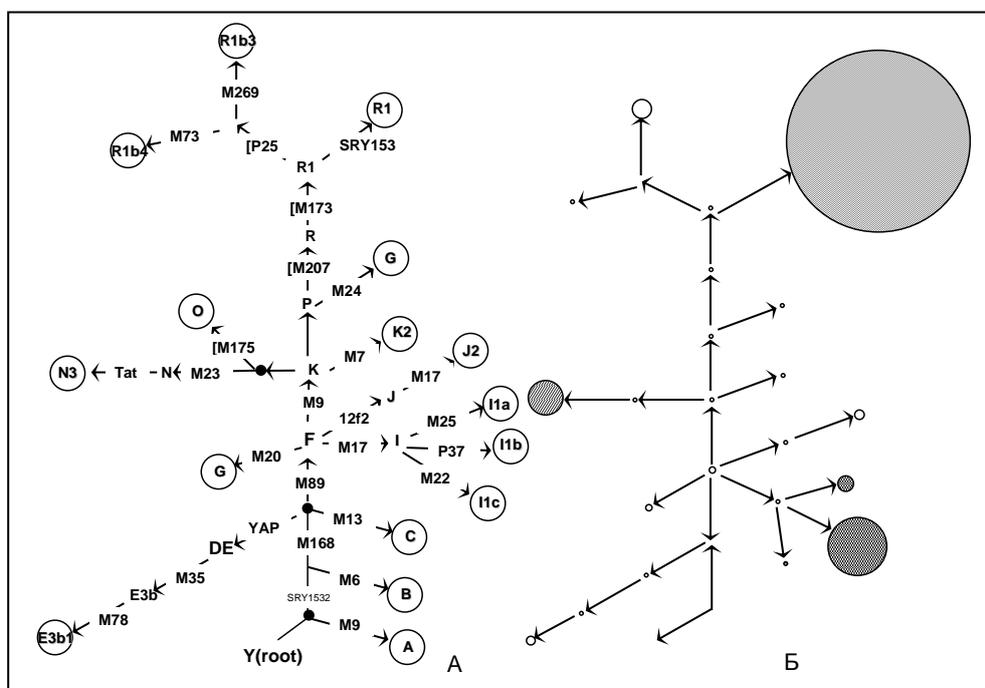


Рис.4. А – гаплогруппы Y-хромосомы и определяющие их биаллельные маркеры (по стрелке); Б – частота биаллельных гаплогрупп, выявленных в белорусской популяции.

Диаметр окружности пропорционален частоте гаплогруппы; окружности доминирующих гаплогрупп заполнены узором (адаптировано из [18])

Частоты гаплогрупп/субгаплогрупп, а также их распределение среди субпопуляций шести регионов Беларуси приведены в таблице 7.

Около 57 % всего разнообразия гаплогрупп приходится на гаплогруппу R, которая включает субгаплогруппы R1a, R1b3, R1b4. Доминирующей среди них является R1a – с частотой около 50 %. Субгаплогруппы R1b3 и R1b4 представлены частотами 5,2 % и 0,35 %, соответственно. Для трёх образцов не удалось установить точное филогенетическое положение на данном этапе исследования: два образца из исследованной выборки с генотипом *SRY₁₅₃₂G*, *M269T*, *M73ins* (инсерция) и *M173C* были обозначены как R1* и один (*M207G*, *M173A*) – как R*. Второй доминирующей гаплогруппой является I, представленная субгруппами I1a, I1b и I1c, а также один образец имеет парафилиетическое положение I*. I1b является преобладающей и достигает 16 %. 25 образцов показали *M253T* – аллель, определяющий субгаплогруппу I1a. Частота наиболее редкого I-субклада – I1c – составила менее 1 %.

На третьем месте по распространенности в белорусской популяции является гаплогруппа N3. Её частота составляет 10 %, причем 94 % от всех N-хромосом приходится на N3 (определяемая *TatC*-аллелем). Три образца – N* – имеют генотип *M231A* и *TatT*.

17 образцов (3 %) имеют 12f2 аллель "1", что определяет гаплогруппу J, причем большая их часть принадлежит к субгруппе J2 (*M172G*). Макрогруппа K представлена 8 образцами, 3 из них классифицированы в субгруппу K2 (*M70C*).

Минорной в белорусской популяции является гаплогруппа G. Она составляет 1,7 % (10 образцов). Набор анализируемых биаллельных маркеров не позволил установить точное положение на филогенетическом древе гаплогрупп Y-хромосомы для 10 образцов (в данной работе они представлены как F*-

образцы). Единичные образцы классифицированы в P и Q* – менее 1 %.

18 (3 %) хромосом из 574 проанализированных имеют YAP+ аллель, и все они генотипированы как гаплогруппа E. Определены субгруппы E3b1 (77 % от общего числа E) и E3b (0,5 %), а также один образец имеет парафилиетическое положение E*.

Распределение гаплогрупп среди популяций шести регионов не является равномерным (Табл. 7). Следует отметить, что для региона Полесья (включая Западное и Восточное), характерны более низкие частоты R1a (около 44 %) и, наоборот, высокие значения I1b, которые в три-семь раз превышают таковые на севере и западе. Популяции Северного и Западного региона в свою очередь характеризуются более высокими частотами N3 и низкими значениями I1b. Также неоднородность следует отметить и в распределении R1b- и G-хромосом (Табл. 7).

Индексы SNP и STR-разнообразия во всех шести субпопуляциях белорусов показывают, что разнообразие SNP (52 % до 55 %) и STR (97 % - 98 %) варьируют незначительно. Полученные данные свидетельствуют о том, что популяция современных белорусов представляет собой скорее единое целое, нежели совокупность отдельных субпопуляций. Отсутствие больших водоразделов и горных цепей на территории Беларуси исключает географический фактор, который, как известно, является важным в возникновении генетической дифференциации популяций человека. Вероятнее всего, племена, давшие начало современным белорусам, не обладали большой генетической разнородностью. Результаты исследований показали, что молекулярное разнообразие популяции на 99% обусловлено разнообразием каждой субпопуляции и менее 1% - различием между их группами.

Таблица 7

Частоты биаллельных гаплогрупп в белорусской популяции

Гаплогруппа/биаллельный маркер

| *Регион | E* | E3b | E3b1 | F* | G* | I* | IIa | IIb | IIc | J* | J2 | K* | K2 | P* | N* | N3 | Q* | R* | R1* | R1a | R1b3 | R1b4 |
|---------|------|------|------|----------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|-------------|------|------|
| | Yap+ | M35 | M78 | M89 T | M201 | M170 | M253 | P37 | M223 | 12f2 | M172 | M9 | M70 | 92R7 | M231 | Tat | M242 | M207 | M173 | SRY 1532 | M269 | M73 |
| Ц, n | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 | 15 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 8 | 0 | 0 | 1 | 48 | 6 | 0 |
| % | 0,00 | 1,08 | 1,08 | 0,00 | 1,08 | 0,00 | 4,30 | 16,13 | 3,23 | 0,00 | 0,00 | 3,23 | 0,00 | 2,15 | 0,00 | 8,60 | 0,00 | 0,00 | 1,08 | 51,61 | 6,45 | 0,00 |
| В, n | 0 | 1 | 4 | 3 | 1 | 0 | 1 | 12 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 | 48 | 7 | 0 |
| % | 0,00 | 1,15 | 4,60 | 3,45 | 1,15 | 0,00 | 1,15 | 13,79 | 1,15 | 0,00 | 2,30 | 0,00 | 1,15 | 0,00 | 1,15 | 5,75 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 55,17 | 8,05 | 0,00 |
| ВП, n | 0 | 1 | 1 | 1 | 6 | 1 | 4 | 22 | 0 | 2 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 43 | 2 | 0 |
| % | 0,00 | 1,02 | 1,02 | 1,02 | 6,12 | 1,02 | 4,08 | 22,45 | 0,00 | 2,04 | 4,08 | 1,02 | 1,02 | 0,00 | 0,00 | 9,18 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 43,88 | 2,04 | 0,00 |
| ЗП, n | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 9 | 33 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 0 | 53 | 6 | 1 |
| % | 0,00 | 0,00 | 1,65 | 0,00 | 1,65 | 0,00 | 7,44 | 27,27 | 0,00 | 0,00 | 3,31 | 0,00 | 0,83 | 0,00 | 0,00 | 7,44 | 0,83 | 0,00 | 0,00 | 43,80 | 4,96 | 0,83 |
| З, n | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 5 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 9 | 0 | 1 | 0 | 43 | 5 | 1 |
| % | 1,33 | 0,00 | 2,67 | 2,67 | 0,00 | 0,00 | 6,67 | 2,67 | 1,33 | 0,00 | 1,33 | 0,00 | 0,00 | 1,33 | 1,33 | 12,00 | 0,00 | 1,33 | 0,00 | 57,33 | 6,67 | 1,33 |
| С, n | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 7 | 2 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 15 | 0 | 0 | 1 | 57 | 4 | 0 |
| % | 0,00 | 0,00 | 3,92 | 3,92 | 0,00 | 0,00 | 1,96 | 6,86 | 1,96 | 0,00 | 3,92 | 0,98 | 0,00 | 0,00 | 0,98 | 14,71 | 0,00 | 0,00 | 0,98 | 55,88 | 3,92 | 0,00 |
| Все-го | 1 | 3 | 14 | 10 | 10 | 1 | 25 | 91 | 7 | 2 | 15 | 5 | 3 | 3 | 3 | 55 | 1 | 1 | 2 | 292 | 30 | 2 |
| % | 0,17 | 0,52 | 2,43 | 1,74 | 1,74 | 0,17 | 4,34 | 15,80 | 0,87 | 0,35 | 2,60 | 0,87 | 0,52 | 0,52 | 0,52 | 9,55 | 0,17 | 0,17 | 0,35 | 50,69 | 5,21 | 0,35 |

Примечания: * - регионы обозначены как Ц – Центральный, В – Восточный, ВП – Восточное Полесье, ЗП – Западное Полесье, З – Запад; во 2-й и 3-й строках таблицы приведены названия гаплогрупп и биаллельных маркеров, соответственно; n – количество образцов, % - частота гаплогруппы/гаплотипа; * - обозначено парафилетическое положение гаплогруппы.

Данные по распределению частот гаплогрупп Y-хромосомы в славянских и некоторых европейских популяциях представлены в таблице 8. В результате генотипирования по 25 биаллельным маркерам было установлено, что по основным составляющим пула Y-хромосомы белорусы наиболее близки к двум другим восточнославянским популяциям – русским и украинцам [66, 24] (для сравнения взяты данные по европейской части России).

Доминирующими во всех трех популяциях являются гаплогруппы R1a, I и N3, которые в сумме покрывают 70-80 % всего разнообразия Y-хромосомы в каждой популяции. Частоты R1a гаплогруппы варьируют незначительно (от 44 % до 50 %). Следует отметить более высокий процент I гаплогруппы у белорусов и у украинцев по сравнению с россиянами (Табл. 8). Россиян отличает также и более высокая частота N3 (14% по сравнению с 9,6 % у белорусов и украинцев).

Таблица 8

Частоты гаплогрупп Y-хромосомы в некоторых европейских популяциях, %

| Популяция | Всего | Гаплогруппа | | | | | | | | Ссылка |
|-----------|-------|-------------|------|------|------|------|------|-----|--------|--------------------------|
| | | R1a | R1b | I | N3 | J2 | E3b | G | другие | |
| Белорусы | 576 | 50,7 | 5,5 | 21,5 | 9,6 | 2,6 | 3,0 | 1,7 | 5,4 | Данная работа |
| Русские | 414 | 48,3 | 0,0 | 15,9 | 14,0 | 1,5 | 4,6 | 1,2 | 14,5 | [66] |
| Латыши | 34 | 41,2 | 14,7 | 0,0 | 32,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 11,8 | [37] |
| Литовцы | 196 | 44,9 | 5,1 | 0,0 | 36,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 13,3 | [55] |
| Поляки | 913 | 57,0 | 11,6 | 17,3 | 3,7 | 2,5 | 4,5 | 0,0 | 3,3 | [69] |
| Хорваты | 108 | 34,3 | 15,7 | 37,0 | 0,0 | 1,9 | 5,6 | 0,9 | 4,7 | [70] |
| Чехи | 257 | 34,2 | 28,0 | 18,3 | 1,6 | 3,5 | 5,1 | 5,1 | 4,3 | [71] |
| Украинцы | 93 | 44,1 | 8,6 | 19,4 | 9,7 | 8,6 | 4,3 | 1,1 | 4,3 | [24] |
| Словаки | 263 | 47,9 | 17,1 | 18,3 | 3,0 | 3,8 | 5,3 | 0,8 | 3,8 | Baldovič, 2005 (неоп. *) |
| Финны | 536 | 7,1 | 3,7 | 28,9 | 58,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,1 | [68] |
| Испанцы | 126 | 2,0 | 68,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 10,0 | 0,0 | 16,0 | [37] |
| Венгры | 36 | 22,0 | 30,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 17,0 | 0,0 | 28,0 | [37] |
| Немцы | 1215 | 17,9 | 38,9 | 23,6 | 1,6 | 4,0 | 6,2 | 0,0 | 7,7 | [69] |
| Болгары | 24 | 12,0 | 17,0 | 0,0 | 0,0 | 12,0 | 17,0 | 0,0 | 42,0 | [37] |

Примечание: * – неопубликованные данные по частотам гаплогрупп Y-хромосомы в популяции словаков взяты из базы данных Эстонского Биоцентра.

Также близкими по частотам гаплогрупп Y-хромосомы к белорусам являются и западные, и южные славяне. Главным дифференцирующим фактором в этом случае является высокая частота R1b (поляки, словаки и чехи), а также E3b (выше у

южных славян). Латыши и литовцы, принадлежащие к другой ветви индоевропейской языковой семьи и граничащие с белорусами на севере, имеют высокую частоту N3 – 30%-35% (гаплогруппа, определяющая финно-угорский компонент). Данная

особенность популяций балтийского региона, а также Скандинавии (доминирование гаплогруппы N3) [55, 67, 68] отличает их от других европейцев, в том числе и от белорусов.

Для того, чтобы установить положение белорусов среди других популяций Европы в смысле их родства по отцовской линии, был выполнен анализ главных компонент (PCA). В анализе использовались частоты основных гаплогрупп – R1a, R1b, I, N3, J2, E3b, G в 14 популяциях; всего проанализировано 4791 Y-хромосом. Полученная диаграмма приведена на рисунке 5.

компоненты составляет 44,5 % и обусловлена в основном частотами гаплогрупп R1a, R1b и I. Изменчивость второй компоненты составляет 22,3 %, что определено различиями в частотах гаплогруппы N3. На полученной диаграмме популяции формируют три группы. Белорусы образуют единый кластер вместе с другими славянами – русскими, украинцами, поляками, словаками, чехами и хорватами. Это обусловлено в основном одинаково высокими частотами R1a и I в данных популяциях.

Генетическая изменчивость первой ком-

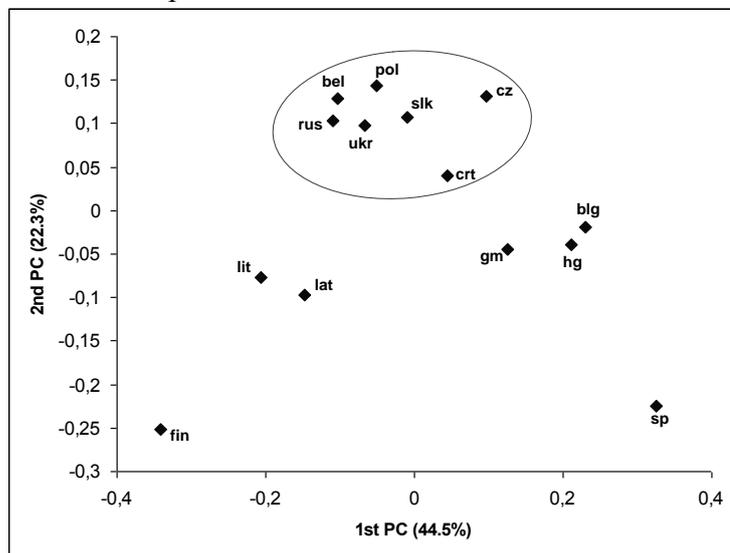


Рис.5. РС-диаграмма, основанная на частотах гаплогрупп Y-хромосомы в некоторых европейских популяциях

Генетическая изменчивость для каждой из компонент приведена в скобках (1st, 2nd PC %). В окружность объединены наиболее близкие к белорусам популяции. Популяции обозначены как: белорусы – bel (настоящее исследование), болгары – blg, хорваты – crt, чехи – cz, финны – fin, немцы – gm, венгры – hg, латыши – lat, литовцы – lit, поляки – pol, русские – rus, словаки – slk, испанцы – sp, украинцы – ukr.

Главным фактором, который объединяет популяции венгров, болгаров, немцев, испанцев в единый кластер, является высокая частота R1b. Латыши, литовцы и финны на диаграмме стоят отдельно за счет высокой частоты N3-хромосом, формируя третий кластер. Сопоставление частот биаллельных гаплогрупп Y-хромосомы и возраста их STR-изменчивости (Табл. 9) в белорусской популяции с таковыми среди других европейцев позволяет предпо-

ложить основные источники этих гаплогрупп и оценить миграционные пути, которые привели к формированию пула Y-хромосомы, наблюдаемого в настоящее время. Следует отметить, что интерпретация данных по оценке возраста должна проводиться с осторожностью. Полученный возраст представляет собой не абсолютный возраст, а накопленную STR-изменчивость этой гаплогруппы в данной популяции. Большое значение имеет и

генеалогия каждой отдельной гаплогруппы, а также количество микросателлитных локусов, взятых в анализ и размер выборки. Полученные возрасты гаплогрупп указывают на то, что их экспансия могла начаться не ранее чем 12000 – 10000 лет до н.э., что вполне согласуется с данными по

археологии и геологии Беларуси [2]. Исключение в этом случае представляют G и Ic гаплогруппы, их возраст совпадает с периодом, когда часть территории Беларуси была непригодна для проживания человека из-за сурового климата (Табл. 9).

Таблица 9

Возраст STR-изменчивости биаллельных гаплогрупп STR-изменчивости в белорусской популяции*

| Гаплогруппа | Количество образцов, взятых для расчета | Возраст (в годах) |
|-------------|---|-------------------|
| R1a | 286 | 12662+/-3747 |
| IIa | 25 | 6624+/-2868 |
| IIb | 90 | 7880+/-2081 |
| Ic | 7 | 15525+/-4116 |
| N3 | 54 | 10733+/-3159 |
| E | 18 | 6612+/-1971 |
| R1b3 | 29 | 11777+/-2688 |
| G | 10 | 14489+/-4591 |

Примечания: Гп – гаплогруппа; СО – стандартная ошибка.

*Использованы данные по STR полиморфизму, полученные в лаборатории НИИКК и СЭ (зав. лаб. И.С. Цыбовский).

Возможным объяснением может быть то, что STR-изменчивость в данных гаплогруппах была накоплена до её попадания на территорию Беларуси, что вполне согласуется с опубликованными данными. Полученные возрасты для R1a, R1b, N3 могут быть интерпретированы как сигнал экспансии в ранний послеледниковый период, который ознаменован полным освобождением территории современной Беларуси от ледника (около 10000 лет до н.э.).

С точки зрения поиска источника/ов разнообразия пула Y-хромосомы белорусов особый интерес представляет региональный анализ субгаплогрупп – R1a, IIb и N3, поскольку они занимают преобладающее положение. Так, гаплогруппа R1a, доминирующая в популяциях восточной Европы, в значительной мере представлена в центральной и северной Европе, встречается на Ближнем Востоке, в центральной и южной Азии [37]. В настоящее время не существует единой гипотезы, которая бы в полной мере объяснила данный пример распространения. Тем не менее,

наиболее вероятным считают возникновение R1a в период верхнего Палеолита (около 15000 лет назад) в западной/южной Азии [22]. Предполагают, что, как минимум, три миграционных эпизода могли привести к доминированию R1a в восточной/юго-восточной Европе: экспансия этой гаплогруппы в ранний послеледниковый период из украинского убежища, миграции из Причерноморской (Понтической) степи около 3000-1000 лет до н.э., а также миграции славян в 5-7 вв. [70]. Вероятно, изучение R1a-хромосом в глобальном масштабе, внутренняя кластеризация и анализ STR-изменчивости позволит “разгадать” её филогению. Другие R-субгаплогруппы – R1b3- и R1b4 также возникли в период Верхнего Палеолита и были привнесены в Европу из западной Азии, однако их послеледниковое распространение/реэксансия, вероятнее всего, происходило из юго-западной Европы (Франко-Кантабрианское убежище) или с территории Малой Азии. Следует отметить меньшую роль данного

миграционного потока при формировании пула Y-хромосомы белорусов.

Гаплогруппа I считается истинно европейской, имеет сложную субструктуру, показаны различные образцы распространения для её субгаплогрупп [72]. Распространение I1b показывает градиент уменьшения с юго-востока на северо-запад Европы. Максимум эта гаплогруппа имеет на Балканах – регионе, который в настоящее время и рассматривают как источник I1b-хромосом для европейских популяций. Другой образец распространения показан для I1a-субгаплогруппы. Вероятнее всего, Пиренейский полуостров является источником послеледникового освоения (реколонизации) Европы носителями I1a, откуда они распространились на восток, юг и север, где данная гаплогруппа имеет максимум частоты.

Среди всех N-субгаплогрупп доминирует N3-тип с ареалом распространения в северной Евразии, а именно, северная Азия и северная и восточная Европа [73]. Показано, что данная гаплогруппа возникла в районе современного Китая, откуда распространялась на север и запад. Северо-восточную Европу можно рассматривать как место вторичной экспансии для N3: высокие частоты этой гаплогруппы отмечены для Волго-Уральских популяций, а также для саамов, финнов и эстонцев. Наблюдаемое в настоящее время распространение N-хромосом объясняется сравнительно недавней экспансией носителей TatC-аллеля в Европу и действием эффекта основателя [73].

Для гаплогрупп J и E отмечен градиент увеличения частоты в направлении с севера на юг, наибольшие частоты обнаружены в южной Европе и северо-восточной Африке. Распространение этих двух гаплогрупп ассоциируют с распространением земледелия в эпоху раннего Неолита с территории Ближнего Востока. Следует отметить незначительный вклад миграций этого периода в пул Y-хромосомы популяций восточной Европы, в том числе и белорусов. Возможно, это

свидетельствует о том, что земледелие на территорию Украины и Беларуси было привнесено не миграциями земледельцев эпохи неолита из Юго-Западной Европы, а заимствовано или привнесено на освободившиеся от ледника земли непосредственно индоевропейцами – праславянскими предками этих народов. Тем более, что первые датировки наличия пыльцы пшеницы и ржи датированы в Западном Полесье периодом в 6-7 тыс. лет тому назад [3], а языковая дифференцировка между славянами датируется 1300 лет, между славянами и балтами – 3400 лет, между славяно-балтами и германцами – 6500 лет, а всех индоевропейцев – 8700 лет тому назад [74].

В целом, анализ разнообразия Y-хромосомы, так же как и мтДНК белорусов, свидетельствует о том, что предки современных белорусов и по мужской, и по женской линии, происходят из единой индоевропейской семьи. Вместе с тем, частотные характеристики гаплогрупп среди коренного белорусского населения позволяют охарактеризовать происхождение белорусов, главным образом, от славянских племен, имеющих, возможно, уже в историческое время некоторые особенности, часть которых сохранились и до настоящего времени. Так же как и другие славянские народы, белорусская нация в генетическом смысле сложилась из составляющих ее славян на территории Беларуси и в настоящее время достаточно гомогенна. Полученные данные дают достаточно оснований сомневаться в правоте гипотезы Седова [11] о происхождении белорусов в результате славяно-балтского или славяноугрофинского синтеза. По крайней мере, частота гаплогруппы N3, маркирующей современных финнов (58 %) [68], литовцев (37 %) [55] и латышей (32 %) [37], у белорусов не столь велика (9,6 %), практически одинакова с украинцами (9,7 %) [24] и даже ниже, чем у русских (14 %) [66]. Скорее разъединение балтов и славян можно объяснить в результате балто-угрофинского синтеза. Сла-

вяне и балты, живущие тысячи лет практически без геологических, географических и политических границ, имеющие практически неотличимые спектры мт ДНК (и, следовательно, общих предков по материнской линии), могли начать развивать разные культуры и языки либо в результате разной экономической деятельности в древности, разделившей их территориально (для первых основным занятием могло быть земледелие, для вторых – охота и рыболовство), либо в результате столкновения с другими этносами. Полученные данные по полиморфизму митохондрий и Y-хромосомы указывают на значительно больший генетический вклад финно-угорских племен в популяции современных литовцев и латышей, чем белорусов.

Анализ полиморфизма аутосом

Анализ встречаемости аллельных вариантов пяти генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний в белорусской популяции выявил некоторые особенности в распределении аллелей и генотипов риска, как в разных этногеографических регионах Беларуси, так и в сравнении с другими народами мира.

Полиморфизм гена аполипопротеина E. Аполипопротеин E является переносчиком холестерина и других липопротеинов крови, определяя, таким образом, общий

уровень липидов в крови. Для гена аполипопротеина E – *apoE* - показано существование трех основных аллелей – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, кодирующих разные изоформы ApoE-белка. Варианты различаются между собой одиночными заменами аминокислотных остатков в их структуре и по-разному влияют на уровень липидов в крови: концентрация холестерина повышается в ряду генотипов $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ [75]. Показана взаимосвязь аллеля $\epsilon 4$ гена *apoE* с риском развития артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца [76], а также случаями мозгового инсульта [77].

По данным *apoE* генотипирования, среди шести этногеографических регионов Беларуси следует особо выделить север страны – Подвинье. Этот регион характеризуется сниженной частотой аллелей $\epsilon 2$ и $\epsilon 4$ гена аполипопротеина E (*apoE*) - 1,9 % и 3,0 % соответственно, что связано с низкими частотами самих генотипов $\epsilon 3/\epsilon 4$ (5,3%) и $\epsilon 2/\epsilon 3$ (3,0 %). Подобные показатели в других этногеографических регионах ранжируются в диапазонах 6,9 % - 12,7 % (генотип $\epsilon 3/\epsilon 4$) и 9,9 % - 21,7 % (генотип $\epsilon 2/\epsilon 3$), что в 2-4 раза превышает значения, полученные для популяции Подвинья. Носители генотипов $\epsilon 2/\epsilon 2$ и $\epsilon 4/\epsilon 4$ в данном регионе вообще не обнаружены (Табл. 10).

Таблица 10

Частота полиморфных аллелей и генотипов гена *apoE* в шести этногеографических популяциях белорусов

| Популяция | $\epsilon 3/\epsilon 3$ | $\epsilon 3/\epsilon 2$ | $\epsilon 3/\epsilon 4$ | $\epsilon 2/\epsilon 4$ | $\epsilon 2/\epsilon 2$ | $\epsilon 4/\epsilon 4$ | p ($\epsilon 2$) | p ($\epsilon 3$) | p ($\epsilon 4$) | n | χ^2 | P |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----|----------|------|
| Центральный | 70,40 | 9,60 | 17,60 | 1,60 | 0,00 | 0,80 | 5,60 | 84,00 | 10,40 | 125 | 1,06 | 0,96 |
| Восточный (Поднепровье) | 67,44 | 8,53 | 21,71 | 2,33 | 0,00 | 0,00 | 5,43 | 82,56 | 12,02 | 129 | 0,03 | 1 |
| Западное Полесье | 68,35 | 12,66 | 16,46 | 0,63 | 1,90 | 0,00 | 8,54 | 82,91 | 8,54 | 158 | 0,04 | 1 |
| Восточное Полесье | 72,22 | 8,73 | 15,08 | 3,97 | 0,00 | 0,00 | 6,35 | 84,13 | 9,52 | 126 | 0,09 | 1 |
| Западный (Понеманье) | 81,19 | 6,93 | 9,90 | 0,99 | 0,99 | 0,00 | 4,95 | 89,60 | 5,45 | 101 | 0,04 | 1 |
| Северный (Подвинье) | 90,91 | 3,03 | 5,30 | 0,76 | 0,00 | 0,00 | 1,89 | 95,08 | 3,03 | 132 | 0,04 | 1 |
| В целом по Беларуси | 74,71 | 8,43 | 14,53 | 1,69 | 0,52 | 0,13 | 5,58 | 86,19 | 8,24 | 771 | 0,03 | 1 |

В таблице: p - частота встречаемости аллеля и/или генотипа, n – численность популяции, χ^2 и P – критерии оценки различия фактических и ожидаемых частот генотипов (при $\lambda=0,05$)

По характеру распределения частот генотипов *aroE* популяция Северного региона достоверно отличается от других этногеографических районов Беларуси ($P < 0,05$), кроме Западного ($P = 0,24$) (Табл.11). Частота аллеля риска $\epsilon 4$ у белорусов в среднем составила 8,24 %, при этом наименьший показатель выявлен в

Северном регионе (3,0 %), наибольший – в Восточном (12,0 %). Следует отметить, что из всей проанализированной популяции в 771 человек только один индивидуум из Центрального региона является гомозиготным носителем аллеля риска $\epsilon 4$; частота генотипа $\epsilon 4/\epsilon 4$ в целом по Беларуси составила 0,13 % (Табл.10).

Таблица 11

Различия по распределению частот генотипов *aroE* гена в шести этногеографических регионах Беларуси по критерию χ^2

| Регион Беларуси | Центральный | Восточный (Поднепровье) | Западное Полесье | Восточное Полесье | Западный (Понеманье) | Северный (Подвинье) |
|-------------------------|--------------|-------------------------|------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| Центральный | χ^2 (P) | 2,91 (0,86) | 3,57 (0,17) | 2,59 (0,76) | 1,87 (0,39) | 17,84 (0,003) |
| Восточный (Поднепровье) | - | - | 6,08 (0,19) | 2,28 (0,52) | 8,28 (0,08) | 22,10 (0,001) |
| Западное Полесье | - | - | - | 7,31 (0,12) | 5,66 (0,23) | 23,09 (0,0001) |
| Восточное Полесье | - | - | - | - | 5,12 (0,27) | 15,32 (0,002) |
| Западный (Понеманье) | - | - | - | - | - | 5,47 (0,24) |

В таблице: жирным шрифтом выделены статистически значимые различия между популяциями

Полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента

В интроне 16 гена ангиотензин-превращающего фермента – ACE – описан *I/D*-полиморфизм, обусловленный наличием (*I*-insertion) или отсутствием (*D*-deletion) *Alu*-повтора. Средняя частота встречаемости *Alu*-инсерции этого гена в мировой популяции составляет 40 % [78]. Однако среди монголоидов аллель *D* встречается с меньшей частотой, чем среди представителей европеоидной и негроидной расы [79, 80]. *I/D* полиморфизм ассоциирован с уровнем фермента в крови: у лиц, гомозиготных по аллелю *D*, содержание ангиотензин-превращающего фермента увеличено почти в два раза по сравнению с гомозиготными носителями *I* [80]. Показана ассоциация генотипа *DD* с риском возникновения миоглобинопатии [81], атеросклероза и гипертрофии левого же-

лудочка [45], спазма коронарных сосудов и инфаркта миокарда [82].

Исследование по распространению *I/D*-полиморфизма гена ACE в разных популяциях Беларуси также выявило статистически достоверное отличие региона Подвинья.

Показано, что *Alu*-инсерция (*I*-аллель) данного гена во всех изученных регионах встречается с частотой, близкой к 50%. В целом в популяции белорусов *I*- и *D*-аллелей представлены с частотой 50,7 % и 49,3% соответственно. А распределение частот генотипов *II*, *ID* и *DD* гена ACE близко к соотношению 1:2:1 во всех этногеографических регионах, кроме Подвинья. Для этой популяции показано снижение частоты встречаемости генотипа *ID* до 35,5%, что близко к частотам гомозигот *II* (34,7%) и *DD* (29,8%) (Табл.12).

Таблица 12

Частоты генотипов *I/D*-полиморфизма гена *ACE* в шести этногеографических регионах Беларуси

| Популяция | p (DD) | p (ID) | p (II) | p (D) | p (I) | n | χ^2 | P |
|--------------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-----|----------|------|
| Центральный регион | 24,79 | 49,57 | 25,64 | 49,53 | 50,43 | 117 | 0,02 | 0,99 |
| Восточный регион (Поднепровье) | 19,51 | 60,98 | 19,51 | 50,00 | 50,00 | 123 | 4,82 | 0,09 |
| Западное Полесье | 21,85 | 47,02 | 31,13 | 45,36 | 54,64 | 151 | 2,08 | 0,35 |
| Восточное Полесье | 26,89 | 53,78 | 19,33 | 53,78 | 46,22 | 119 | 1,72 | 0,42 |
| Западный регион (Понеманье) | 25,25 | 50,51 | 24,24 | 50,51 | 49,49 | 99 | 0,03 | 0,98 |
| Северный регион (Подвинье) | 29,84 | 35,48 | 34,68 | 47,58 | 52,42 | 124 | 8,90 | 0,01 |
| В целом по Беларуси | 24,56 | 49,39 | 26,06 | 49,25 | 50,75 | 733 | 0,03 | 0,98 |

В таблице: p - частота встречаемости аллеля и/или генотипа, n – численность популяции, χ^2 и P – критерии оценки различия фактических и ожидаемых частот генотипов (при $\lambda=0,05$).

Вследствие аномального соотношения генотипов, популяция Подвинья статистически достоверно отличается от других этногеографических регионов страны ($P<0,05$) (Табл.13). Обратная закономерность по частоте встречаемости генотипа *ID* гена *ACE* выявлена в восточной популяции - Поднепровье. В этом регионе, наоборот, наблюдается увеличение доли гетеро-

зиготных носителей *ID* до 61 %, что в 3 раза превышает частоту *II*- и *DD*-гомозигот (по 19,5 %). При статистическом сравнении Поднепровья с другими регионами Беларуси по частотам распределения генотипов показаны достоверные отличия этой популяции от населения Подвинья ($P=0,001$) Западного и Восточного Полесья ($P=0,03$ и $P=0,04$ соответственно) (Табл.13).

Таблица 13

Различия по распределению частот генотипов *ACE* гена в шести этногеографических регионах Беларуси по критерию χ^2

| Регион Беларуси | Центральный | Восточный (Поднепровье) | Западное Полесье | Восточное Полесье | Западный (Понеманье) | Северный (Подвинье) |
|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| Центральный | χ^2 (P) | 4,84 (0,09) | 2,10 (0,35) | 1,73 (0,42) | 0,05 (0,97) | 8,92 (0,01) |
| Восточный (Поднепровье) | - | - | 6,90 (0,03) | 6,53 (0,04) | 4,85 (0,09) | 13,72 (0,001) |
| Западное Полесье | - | - | - | 3,79(0,15) | 2,11 (0,35) | 0,98 (0,004) |
| Восточное Полесье | - | - | - | - | 1,75 (0,42) | 10,62 (0,005) |
| Западный (Понеманье) | - | - | - | - | - | 8,93 (0,01) |

В таблице: жирным шрифтом выделены статистически значимые различия между популяциями.

Полиморфизм гена ангиотензиногена

Полиморфизм T174M гена ангиотензиногена – AGT – обусловлен заменой треонина (аллель T) на метионин (аллель M) в 174-м положении полипептидной цепи ангиотензиногена. Показана ассоциация M аллеля с риском развития эссенциальной гипертензии [83], коронарной болезни сердца [84]. В популяции русских у носителей генотипа TT снижен риск инфаркта миокарда в случае, если нет сопутствующей артериальной гипертензии [85], а аллель M является фактором риска развития кардиопатий [46]. В популяциях народов мира частота TT генотипа в несколько раз превышает частоту гетерозигот TM, а носители генотипа MM встречаются редко или же не встречаются вовсе [77].

Результаты исследования полиморфизма T174M гена AGT у белорусов представлены в таблице 14, из которой видно, что частота встречаемости неблагоприятного аллеля M в Восточном регионе сравнительно низкая (9,5 %): только 19 % населения являются гетерозиготными

носителями этого аллеля, а индивидуумы с генотипом риска MM вообще не выявлены. В других регионах Беларуси частота аллеля M достаточно высока и варьирует от 16,7 % (Центральный регион) до 19,21 % (Западное Полесье) (Табл.14). По распределению частот генотипов AGT гена популяция Поднепровья статистически достоверно отличается от всех этногеографических регионов страны ($P < 0,05$) (Табл.15).

В целом в популяции белорусов генотипы TT, TM и MM распространены с частотой 68,5 %, 29,7 % и 1,8 %, соответственно, а частота встречаемости аллеля риска M составила 16,6 % (Табл.14). Следует отметить, что в других популяциях мира этот показатель значительно ниже и ранжируется в диапазоне 4,5 % – 13,6 %. Данные по встречаемости генотипов и аллелей гена AGT в Поднепровье близки к таковым в исследованных популяциях русских (Москва, 10,8 % [46]), что, вероятно, связано с территориальной близостью России или общностью происхождения.

Таблица 14

Частоты генотипов T174M-полиморфизма гена AGT в шести этногеографических регионах Беларуси

| Популяция | р (ТТ) | р (ТМ) | р (ММ) | р (Т) | р (М) | n | χ^2 | P |
|--------------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-----|----------|------|
| Центральный регион | 68,38 | 29,91 | 1,71 | 83,33 | 16,67 | 117 | 0,01 | 0,99 |
| Восточный регион (Поднепровье) | 80,99 | 19,01 | 0,00 | 90,50 | 9,50 | 121 | 0,01 | 0,99 |
| Западное Полесье | 63,58 | 34,44 | 1,98 | 80,79 | 19,21 | 151 | 0,01 | 0,99 |
| Восточное Полесье | 67,23 | 28,57 | 4,20 | 81,51 | 18,49 | 119 | 0,01 | 0,99 |
| Западный регион (Понеманье) | 63,83 | 35,11 | 1,06 | 81,38 | 18,62 | 94 | 0,02 | 0,98 |
| Северный регион (Подвинье) | 67,48 | 30,89 | 1,63 | 82,93 | 17,07 | 123 | 0,01 | 0,99 |
| В целом по Беларуси | 68,55 | 29,66 | 1,79 | 83,38 | 16,62 | 725 | 0 | 1 |

В таблице: р - частота встречаемости аллеля и/или генотипа, n – численность популяции, χ^2 и P – критерии оценки различия фактических и ожидаемых частот генотипов (при $\lambda=0,05$).

Таблица 15

Различия по распределению частот генотипов гена *AGT* в шести этногеографических регионах Беларуси по критерию χ^2

| Регион Беларуси | Центральный | Восточный (Поднепровье) | Западное Полесье | Восточное Полесье | Западный (Понеманье) | Северный (Подвинье) |
|-------------------------|--------------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| Центральный | χ^2 (P) | 8,25 (0,02) | 0,71 (0,70) | 2,85 (0,24) | 0,87 (0,65) | 0,03 (0,98) |
| Восточный (Поднепровье) | - | - | 13,50 (0,001) | 14,03 (0,001) | 14,99 (0,001) | 9,21 (0,01) |
| Западное Полесье | - | - | - | 3,00 (0,22) | 0,58 (0,75) | 0,53 (0,77) |
| Восточное Полесье | - | - | - | - | 5,58 (0,06) | 2,94 (0,23) |
| Западный (Понеманье) | - | - | - | - | - | 0,59 (0,74) |

В таблице: жирным шрифтом выделены статистически значимые различия между популяциями.

Полиморфизм гена эндотелиальной синтазы окиси азота.

Эндотелиальная синтаза окиси азота, кодируемая геном *eNOS*, катализирует синтез оксида азота (*NO*). Нарушение синтеза *NO* занимает ведущее место в патогенезе гипертензии и атеросклероза сосудов [47]. Полиморфизм гена *eNOS* обусловлен 4- и 5-кратным минисателлитным повтором (аллель *a* и *b* соответственно) в четвертом интроне - *4a/b*. У людей с генотипом *bb* уровень *NO* в крови в два раза ниже, чем у носителей генотипа *aa* [86]. В исследованных европейских популяциях преобладает *b* аллель. Показана его тесная ассоциация с риском развития атероскле-

роза, гипертензии и ишемической болезни сердца [47]. По данным анализа частот аллелей минисателлита *4a/b* гена *eNOS* в шести этногеографических популяциях, Восточный регион достоверно отличается от запада страны - региона Понеманья ($P = 0,05$) и Западного Полесья ($P = 0,04$) (Табл.17). Восточная популяция характеризуется максимальной частотой аллеля *b* (84,9 %) среди жителей Беларуси. Средний показатель встречаемости аллеля *b* в белорусской популяции составил 81,9 %. Кроме того, Восточный регион характеризуется низкой частотой генотипа *ab* - 19,48 %; в других регионах этот показатель близок к 30 % (Табл.16).

Таблица 16

Частоты генотипов *4a/b*-полиморфизма гена *eNOS* в шести этногеографических регионах Беларуси

| Популяция | p (aa) | p (ab) | p (bb) | p (a) | p (b) | n | χ^2 | P |
|--------------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-----|----------|------|
| Центральный регион | 7,20 | 27,20 | 65,60 | 21,80 | 79,20 | 125 | 0,03 | 0,99 |
| Восточный регион (Поднепровье) | 5,43 | 19,48 | 75,19 | 15,12 | 84,88 | 129 | 0,06 | 0,97 |
| Западное Полесье | 2,53 | 31,65 | 65,82 | 18,35 | 81,65 | 158 | 0,001 | 1 |
| Восточное Полесье | 2,34 | 29,69 | 67,97 | 17,19 | 82,81 | 128 | 0,002 | 1 |
| Западный регион (Понеманье) | 2,08 | 32,29 | 65,63 | 18,23 | 81,77 | 96 | 0,01 | 1 |
| Северный регион (Подвинье) | 6,02 | 27,07 | 66,92 | 19,55 | 80,45 | 133 | 0,02 | 1 |
| В целом по Беларуси | 4,29 | 27,83 | 67,88 | 18,21 | 81,79 | 769 | 0,004 | 1 |

В таблице: p - частота встречаемости аллеля и/или генотипа, n – численность популяции, χ^2 и P – критерии оценки различия фактических и ожидаемых частот генотипов (при $\lambda=0,05$).

Таблица 17

Сравнительный анализ распределения частот генотипов *eNOS* гена в шести этногеографических регионах Беларуси

| Регион Беларуси | Центральный | Восточный (Поднепровье) | Западное Полесье | Восточное Полесье | Западный (Понеманье) | Северный (Подвинье) |
|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| Центральный | χ^2 (P) | 2,82 (0,24) | 3,78 (0,15) | 3,33 (0,19) | 3,33 (0,19) | 0,15 (0,93) |
| Восточный (Поднепровье) | - | - | 6,53 (0,04) | 4,82 (0,09) | 5,93 (0,05) | 2,33 (0,31) |
| Западное Полесье | - | - | - | 0,15 (0,93) | 0,06 (0,97) | 2,65 (0,26) |
| Восточное Полесье | - | - | - | - | 0,18 (0,91) | 2,25 (0,32) |
| Западный (Понеманье) | - | - | - | - | - | 2,51 (0,28) |

В таблице: жирным шрифтом выделены статистически значимые различия между популяциями

В целом, в белорусской популяции частоты генотипов *4a/b*-локуса гена *eNOS* составили 4,3 % (генотип *aa*), 27,8 % (генотип *ab*) и 67,9 % (генотип *bb*).

Полиморфизм гена липопроteinлипазы Фермент липопроteinлипаза осуществляет распад триглицеридов до глицерола и жирных кислот для дальнейшего метаболизма в клетке. В случае, если фермент дефектен, в крови значительно возрастает уровень триглицеридов. Накопление последних в кровяном русле способствует образованию атеросклеротических бляшек, которые в конечном итоге могут привести к закупорке сосуда [87]. Полиморфизм гена липопроteinлипазы (*LPL*) связан с *C-G* трансверсией, что соответствует замене серина на стоп-кодон в 447 положении аминокислотной цепочки белка - *Ser447Stop*. Показана ассоциация генотипа *CC* (*Ser447Ser*) с повышенным уровнем триглицеридов в крови и, как следствие, с развитием гипертриглицеридемии и атеросклероза [48].

Результаты исследования полиморфизма *Stop447Stop* гена *LPL* в белорусских популяциях представлены в таблице 18. Следует отметить, что наибольшая частота протективного аллеля *G* (соответствует *Stop* кодону в первичной структуре белка) наблюдается в Центральном регионе, хотя гомозиготных носителей *GG* (*Stop447Stop*) в этом регионе вообще не обнаружено. Высокая частота *G*-аллеля обусловлена значительной долей гетерозигот в Центральной популяции – 21 %, в то время как в других регионах этот показатель не превышает 14 %. (Табл.18).

При сравнении этногеографических регионов между собой по распределению частот *LPL* генотипов выявлены статистически достоверные отличия Центрального региона от Поднепровья и Подвинья ($P = 0,02$ и $P = 0,001$ соответственно) (Табл.19), где частота носителей генотипа *CC* (*Ser447Ser*) превышает 90 %, а гетерозиготы *CG* представлены только 6-7% (Табл.18).

Таблица 18

Частоты генотипов Ser447Stop-полиморфизма гена *LPL* в шести этногеографических регионах Беларуси

| Популяция | Р (С/С) | р (С/Г) | р (G/G) | р (С) | р (G) | n | χ^2 | P |
|--------------------------------|---------|---------|---------|-------|-------|-----|----------|-------|
| Центральный регион | 79,03 | 20,97 | 0 | 89,52 | 10,48 | 124 | 0,01 | 0,99 |
| Восточный регион (Поднепровье) | 84,43 | 13,93 | 1,64 | 91,39 | 8,61 | 122 | 352,42 | <0,05 |
| Западное Полесье | 87,90 | 11,46 | 0,64 | 93,63 | 6,37 | 157 | 99,68 | <0,05 |
| Восточное Полесье | 84,38 | 14,84 | 0,78 | 91,80 | 8,20 | 128 | 86,05 | <0,05 |
| Западный регион (Понеманье) | 92,78 | 7,22 | 0 | 96,39 | 3,61 | 97 | 6,11 | 0,047 |
| Северный регион (Подвинье) | 93,18 | 6,06 | 0,76 | 96,21 | 3,79 | 132 | 392,76 | <0,05 |
| В целом по Беларуси | 86,84 | 12,50 | 0,66 | 93,09 | 6,91 | 760 | 90,26 | <0,05 |

В таблице: р - частота встречаемости аллеля и/или генотипа, n – численность популяции, χ^2 и P – критерии оценки различия фактических и ожидаемых частот генотипов (при $\lambda=0,05$).

Таблица 19

Сравнительный анализ распределения частот генотипов *LPL* гена в шести этногеографических регионах Беларуси

| Регион Беларуси | Центральный | Восточный (Поднепровье) | Западное Полесье | Восточное Полесье | Западный (Понеманье) | Северный (Подвинье) |
|-------------------------|--------------|-------------------------|------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| Центральный | χ^2 (P) | 3,99 (0,14) | 5,43 (0,06) | 2,51 (0,28) | 8,10 (0,02) | 13,12 (0,001) |
| Восточный (Поднепровье) | - | - | 1,07 (0,58) | 0,42 (0,81) | 4,24 (0,12) | 4,95 (0,08) |
| Западное Полесье | - | - | - | 0,74 (0,69) | 1,88 (0,39) | 2,56 (0,28) |
| Восточное Полесье | - | - | - | - | 3,98 (0,14) | 5,39 (0,07) |
| Западный (Понеманье) | - | - | - | - | - | 0,85 (0,65) |

В таблице: жирным шрифтом выделены статистически значимые различия между популяциями

Таким образом, анализ таких аутосомных молекулярных маркеров как *apoE*, *ACE*, *AGT*, *eNOS*, *LPL* выявил явные особенности в генетической структуре двух популяций Беларуси – Подвинья (Северный регион) и Поднепровья (Восточный регион). Генетические отличия этих популяций могут иметь адаптивную ценность к условиям среды и быта, сложившуюся в течение длительного периода времени. Сопоставление полученных результатов по генам *apoE*, *ACE*, *AGT*, *eNOS* и *LPL* с ли-

тературными данными выявило ряд особенностей генетической структуры белорусской популяции по сравнению с другими народами мира.

Белорусская популяция характеризуется низкой частотой встречаемости аллеля риска $\epsilon 4$ гена *apoE* (8,24 %) относительно граничащих народов (поляки - 10,6 %, русские (Москва) - 11,1 %) и стран Центральной Европы: немцы - 14,5 %, бельгийцы - 16,3 %, французы - 12,1 %, англичане - 14,4 % [88]. Частота $\epsilon 4$ в Бела-

руси близка к таковой в странах Южной Европы – Италия, Испания, Турция, Кипр (7,0 - 9,1 %) [49].

Частота аллеля риска *D* гена ангиотензин-превращающего фермента (*ACE*) у белорусов находится на средневропейском уровне (48-50 %) [79]. Однако по распределению частот генотипов выявлены достоверные отличия между белорусской популяцией и некоторыми странами Европы – Франции [85], Испании [89], Португалии [90] - где частота встречаемости *I*-аллеля (*Alu*-инсерции), как и его гомозиготных носителей, значительно ниже, чем в Беларуси.

Аллель риска *M* гена ангиотензиногена (*AGT*) у белорусов встречается с частотой 16,6 %, что превышает таковую у населения таких европейских государств, как Германия (12,7 %) [91] и Франция (11,8 %) [85], и азиатских народов (4-10 %) [92,93]. Частота *M*-аллеля у белорусов выше и по сравнению с данными по российским популяциям: русские Москвы - 10,8 % [46], русские Башкортостана – 13,6 % [94].

Частоты генотипов гена *eNOS* в популяции белорусов сопоставимы с соседствующими славянскими народами - украинцами и русскими. Следует отметить, что генотип *aa* в исследованных белорусских и украинских популяциях встречается значительно чаще, чем у русских (4,3 % и 5,0 % против 1,5 % соответственно) [88, 95]. Интересно отметить, что наиболее близкой к белорусам по характеру распределения генотипов *eNOS* оказалась немецкая популяция - 4,5 % (генотип *aa*), 29,1 % (генотип *ab*), 66,7 % (генотип *bb*) - $P=0,94$ [96].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, по аутосомным маркерам, так же как и по гаплотипам мт ДНК и Y-хромосомы, белорусская популяция проявила себя как типичная европейская популяция, имеющая, конечно, некоторые особенности как по отношению к другим народам, так и внутривнутрипопуляционные раз-

личия. Так, Северный регион (Подвинье), место проживания известных по летописям кривичей, отличался от других регионов Беларуси пониженной частотой аллелей $\epsilon 2$ и $\epsilon 4$ гена аполипопротеина E и генотипа *ID* гена *ACE*, пониженной частотой гаплогруппы *I1b*, повышенной частотой гаплогруппы *N3* Y-хромосомы и повышенной частотой кластера митохондриальных гаплогрупп *JT*. Восточный регион, место проживания радимичей, отличается от всех других регионов снижением частоты аллеля *M* гена *AGT*, максимальная частота аллеля *b* гена *eNOS*, повышенная частота гаплотипа *R1b3*, пониженная частота гаплотипа *I1a* и *N3* Y-хромосомы, максимальная частота гаплотипа *U* и кластера гаплотипов *N* митохондриальной ДНК. Западное Полесье, где наряду с другими регионами проживали дреговичи, имеет максимальную частоту гаплотипов *I1b* и *I1a* Y-хромосомы. Являются ли эти и другие частотные различия между регионами отражением некогда существовавших генетических племенных различий между восточными славянами или следствием многочисленных миграционных процессов, протекающих в течение десятков тысяч лет? К сожалению, для однозначного ответа на этот вопрос имеющихся в настоящее время данных пока недостаточно. Можно только предположить, что, скорее всего, вклад в эти различия внесены как генетической дифференциацией, так и миграционными процессами.

Совокупность представленных в данной работе результатов исследований представляет собой лишь набросок к генетическому «портрету» современной белорусской популяции, который включает анализ молекулярных маркеров мтДНК, Y-хромосомы и ряда аутосом. На многие вопросы еще придется ответить в будущих, более детальных исследованиях.

Проведен филогенетический анализ белорусской популяции двух взаимодополняющих участков генома – митохондриальной ДНК и нерекombинирующего района Y-хромосомы. Установлено, что

композиция мтДНК или “материнский генетический” компонент в белорусской популяции представлен западным вариантом евроазиатского типа. Около 88 % общего разнообразия митохондрий составляют гаплогруппы, происходящие от макрогаплогруппы R: H, U, J, T, V, HV. Малая доля приходится на ветви макрогруппы N (9 %) и азиатской группы M (2,4 %). Отцовский компонент белорусов, в свою очередь, также представлен в основном европейским типом (R1a, R1b, I1a, I1b, I1c, F, K, G – 80 %), финно-угорским (субгаплогруппа N3 – 9,6 %), и лишь незначительная часть представлена африканским (гаплогруппа E – 3,1 %) и ближневосточным (гаплогруппа J – 2,9 %) компонентами.

Распределение гаплогрупп Y-хромосомы и мтДНК на внутривнутрипопуляционном уровне не является гомогенным. Следует отметить, что дифференциация гаплогрупп Y-хромосомы имеет более выраженный характер в сравнении с мтДНК. Так, можно выделить регион Полесье (Западное и Восточное), Западный и Северный, а также популяцию Востока Беларуси. По распределению гаплогрупп мтДНК очевидны отличия Восточного Полесья и Восточного региона. Картина распределения митохондриальных гаплогрупп белорусской популяции свидетельствует о незначительном перемещении женщин в прошлом (по крайней мере за последние 10000 лет).

Полученные возрастные характеристики для основных гаплогрупп белорусской популяции (время коалесценции для мтДНК и накопленной STR-изменчивости для Y-хромосомы) согласуются с опубликованными данными [72, 73, 18]. Их интерпретация должна проводиться с осторожностью, с учетом общей филогении конкретной гаплогруппы, а также данных других наук (археологии, геологии и т.д.). Так, возрасты “сложных” гаплогрупп (например, гаплогрупп мтДНК) и их ветвей указывают на период, когда климатические условия на территории Беларуси не были пригодными для существования человека.

Как было показано [50, 61, 62], кластеризация таких гаплогрупп и последующая оценка возрастов субкластеров указывает на их раннюю послеледниковую экспансию. В случае Y-хромосомы возраст накопленной STR-изменчивости в белорусской популяции указывает на их (экспансию) распространение в период 15000-10000 д.н.э.

Полученные молекулярно генетические данные позволяют дополнить данные по археологии и геологии информацией не только о примерном времени, но и об основных путях заселения современной территории Беларуси. Так, реколонизация Европы в послеледниковый период происходила за счет миграций из так называемых “ледниковых убежищ”, наиболее значимыми были Франко-Кантабрианское (территория северной Испании - южной Франции), Альпийское, Украинское (территория современной Украины). Следует отметить преобладающую роль генетических потоков из юго-восточной Европы (территория Украины, Прикаспия) в формировании пула мтДНК и Y-хромосомы белорусов. Об этом свидетельствует наличие гаплогруппы R1a, I1b, G, Y-хромосомы, и митохондриальных гаплогрупп – U2, U3, H2, H5. За счет миграций из юго-западной Европы были привнесены гаплогруппы H1, U5, U7, U8, а также Y-хромосомальные R1b, I1a. В целом, белорусская популяция характеризуется высоким разнообразием как мтДНК, так и Y-хромосомы. Это может быть связано с географическим положением современной территории Беларуси, население которой подвергалось сложным миграционным процессам на протяжении длительного времени.

По композиции митохондриальных гаплогрупп белорусы в одинаковой степени близки как к славянским (русские, украинцы, поляки, хорваты), так и к неславянским популяциям (балтам, германцам), что указывает на общих предков по материнской линии. По составу же гаплогрупп Y-хромосомы белорусы являются близкими популяциям славян (как к «соседям»),

так и к географически удаленным), и несколько более удалены от неславянских соседей (финнов и балтов). При этом белорусы, русские и украинцы представляют наиболее близкие в плане их отцовской истории популяции. Эти данные свидетельствуют о высоком уровне генетического родства белорусов с другими европейскими популяциями, как по отцовской, так и по материнской линиям, а также указывают на то, что славяне являются потомками скорее одной, чем нескольких генетически близких популяций-прародителей. Полученные данные не позволяют вывести прямое происхождение белорусов ни от других славянских народов (поляков и русских), ни от балтов. Все эти, как и многие другие европейские народы имели общих прародителей, как по мужской, так по женской линиям. Вероятнее всего, дифференциация предков белорусов от общих индоевропейских (праславянских) предков проходила на территории самой Беларуси, путем их расселения с юго-запада на северо-восток, что подтверждается и более ранними (6-7 тыс. лет тому назад) находками пыльцы пшеницы и ржи в Юго-Западной Беларуси, чем в Северо-Восточной (3-4 тыс. лет тому назад [3] и рассчитанным временем языковой дифференциации славян (1300 лет), славян и балтов (3400 лет), балто-славян и германцев (6500 лет) [74].

Выявленный градиент распространения некоторых гаплогрупп Y-хромосомы и аллеля риска $\epsilon 4$ гена *apoE* с изменением частот в сторону соседей (IIb, IIa, G, R1b) характерный для всех европейских народов [72, 73, 37, 49] свидетельствует скорее о присутствии постоянного генетического обмена между географически близкими популяциями, чем о возникновении одного этноса путем синтеза из двух соседних.

Исследование белорусской популяции на предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям выявило, что частоты встречаемости аллелей генов *ACE*, *AGT*, *eNOS*, *apoE* и *LPL* в Беларуси сопоставимы с данными по другим евро-

пейским народам, хотя и имеют некоторые особенности. Продемонстрирован высокий процент аллеля *M* гена *AGT* (16,6 %) и сниженная частота $\epsilon 4$ -аллеля гена *apoE* (8,2 %) и аллеля *G* гена *LPL* (6,91 %). Показан ряд особенностей в распределении аллелей риска исследуемых генов в шести этногеографических регионах Беларуси: выявлены отличия регионов Подвинья и Поднепровья по частотам встречаемости генов *ApoE*, *ACE*, *AGT* и *eNOS*. Полученные по этому разделу результаты представляют несомненный интерес не только для генетиков, но и для медиков, и должны быть учтены при прогнозировании рисков по заболеваемости населения Беларуси, связанных с сердечно-сосудистыми патологиями.

Таким образом, полученные молекулярно-генетические данные в целом согласуются с фактами, накопленными археологами, антропологами, геологами и историками и представляют собой дополнительный материал для воссоздания подлинной истории белорусского этноса.

Список использованных источников

1. Avise, J.C., Arnold J., Ball, R.M. et al. // *Ann. Rev. Ecol. System.* 1987. V. 18. P. 489-522.
2. Зайкоускі, У.Ф. Археалогія Беларусі. Т.1. Каменны і бронзавы вякі. Мн. «Беларуская навука». 1997. 424 с.
3. Zernitskaya V., Mikhailov N. Records of early farming in pollen spectra of the Holocene in Belarus (2007, in press).
4. Цягака, Л.І. Беларусь. Т.9. Антрапалогія. Мн. «Беларуская навука». 2006. 424 с.
5. Golembiowski, L. *Lud polski, jego zwyczai i zababony.* Warszawa. 1830.
6. Соболевский А. Лекции по истории русского языка. Вып. 1. Киев. 1886.
7. Срезневский, И. Мысли об истории русского языка и других славянских наречий. Спб. 1887.
8. Ластоускі, В. Кароткая гісторыя Беларусі. 1910.

9. Карский Е. Белорусы. Введение к изучению языка и народной словесности. Вильно. 1904.
10. Токарев С.А. Этнография народов СССР. М. 1958. С. 25–30. 55 с.
11. Седов В.В. Славяне Верхнего Поднепровья и Подвинья // Материалы и исследования археологии СССР. Вып. 163. М. 1970.
12. Пилипенко М.Ф. Возникновение Белоруссии. Мн. «Беларусь». 1991. 143 с.
13. Wallace D.C., Brown M.D., Lott M.T. // *Gene*. 1999. V. 238. P. 211-230.
14. Underhill P.A., Shen P.D., Lin A.A. et al. (21 co-authors) // *Nat. Genet.* 2000. V. 26. P. 358–361.
15. Jobling M.A., Tyler-Smith C. // *Nat. Rev. Genet.* 2003. V. 4. 598–612.
16. Torroni, A., Achilli, A., Macaulay, V. et al. // *TRENDS in Genetics*. 2006. V. 22. P. 339-345.
17. Forster P. // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 2004. V. 359. P. 255-264.
18. Richards M.B., Macaulay V., Hickey E., Vega et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. P. 1251-1276.
19. Balter M. // *Science*. 2003. V. 310. № 5750. P. 964-965.
20. Sampietro M.L., Lao O., Caramelli D. et al. // *Proc Biol Sci*. 2007. V. 274. №. 1622. P. 2161.
21. Underhill P. // *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2003. V. LXVIII. P. 487–493.
22. Kivisild T., Rootsi S., Metspalu M. et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 72. P. 313-332.
23. Мікуліч А. І. Беларусь. Т.9. Антрапалогія. Мн. «Беларуская навука». 2006. С. 365-414.
24. Kharkov V., Stepanov V., Borinskaya S., Kozhskoaeva G. et al. // *Genetika (in russian)*. 2004. V.40. № 3. P. 415-421.
25. Belyaeva O., Bermisheva M., Khrunin A. et al. // *Hum Biol.* 2003. V. 75. № 5. P. 647-660.
26. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F. et al. // *Nature Genet.* 1999. V. 23. P. 147.
27. Torroni A., Huoponen K., Francalacci P. et al. // *Genetics*. 1996. V. 144. P. 1835-1850.
28. Finnilä S., Lehtonen M. S., Majamaa K. // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 68. P. 1475-1484.
29. Macaulay V.A., Richards M.B., Hickey E. et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 64. P. 232-249.
30. Torroni A., Bandelt H. - J., D'Urbano L., Lahermo P. et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. V. 62. P. 1137-1152.
31. Kivisild T., Metspalu M., Bandelt H.-J. et al. // *Nucleic Acids and Mol. Biol.* 2006. V. 18. P. 149-179.
32. A Nomenclature System for the Tree of Human Y-Chromosomal Binary Haplogroups // *The Y Chromosome Consortium* 2002. V. 12, №. 2. P. 339-348.
33. Whitfield L. S., Sulston, J. E. and Goodfellow, P. N. // *Nature*. 1995. V. 378. P. 379–380.
34. Mathias N., M. Bayés and C. Tyler-Smith. // *Hum. Mol. Genet.* 1994. V. 3. P. 115–123.
35. Zerjal T., Dashnyam B., Pandya A., et al. // *Am J Hum Genet.* 1997. V. 60. P. 1174-1183.
36. Cinnioglu C., King, R., Kivisild T. et al. // *Hum Genet.* 2004. V.114. P. 127–148.
37. Rosser Z., Zerjal T., Hurles M. et al. // *Am J Hum Genet.* 2000. V. 67 P. 1526–1543.
38. Hammer M. F. and S. Horai. // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. V. 56. P. 951–962.
39. Butler J.M. // *Forensic Sci Rev.* 2003. V. 15. P. 91-111.
40. Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37-48.
41. Zhivotovsky L., Underhill P., Cinnioglu C. et al. // *Am J Hum Genet.* 2004. V. 74. P. 50–61.
42. Forster P., Harding R., Torroni A., Bandelt H.-J. // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 59. P. 935-945.
43. Watson E., Forster P., Richards M., Bandelt H.-J. // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 61. P. 691-704.
44. Saillard J., Forster P., Lynnerup N. et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. P. 718-726.
45. Prasad N., O'Kane K., Johnstone H. et al. // *Quart. J. Med.* 1994. V.87. P.659-662.
46. Чистяков Д.А., Туракулов Р.И., Моисеев В.С., Носиков В.В. // *Генетика*. 1999. Т.35, № 8. С.1160-1164

47. Heltianu C., Costache G., Gafencu A. et al. // *J. Cell. Mol. Med.* 2005. V.9, № 1. P.135-142
48. Humphries S. E., Nicaud V., Margalef J. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998. V.18, № 4. P. 526-534.
49. Lucotte G., Loirat F., Hazout S. // *Hum. Biol.* 1997. V.69. P.253-262.
50. Loogväli E.-L., Roostalu U., Malyarchuk B.A. et al. // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. № 11. P. 2012-2021.
51. Кушнеревич Е.И., Сивицкая Л.Н., Даниленко Н.Г. и др. // Доклады Академии наук Беларуси. 2007. Т. 51, №1. С.79-83.
52. Malyarchuk B.A., Grzybowski T., Derenko, M.V. et al. // *Ann. Hum Genet.* 2002 V.66. P. 261-283.
53. Pericic M., Barac L.L., Martinovic K. I. et al. // *Croat Med J.* 2005. V.6, № 4. P. 502-513.
54. Koledova Z. Tracing the maternal genetic roots of Slovaks - phylogenetic and phylogeographic analysis of mitochondrial DNA variability in Slovak population M. Sc. Thesis. Bratislava 2005.
55. Kasperavičiute D., Kučinskas V. and Stoneking M. // *Ann Hum Genet.* 2004. V. 68. P. 438-452.
56. Pliss L., Tambets K., Loogväli E.L. et al. // *Ann Hum Genet.* 2006. V. 70. P.439-458.
57. Hofmann S., Jaksch M., Bezold R. et al. // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V. 6. P. 1835-1846.
58. Meinilä M., Finnilä S., Majamaa K. // *Hum. Hered.* 2001. V. 52. P. 160-170.
59. Crespillo M., Paredes M., Luque J.A. et al. // *ICS.* 2004. V. 1261. P.407-409.
60. Pereira L., Richards M., Goios A. et al. // *Genome Res.* 2005. V.15. P. 19-24.
61. Achilli A., Rengo C., Magri C. // *Am J Hum Genet.* 2004. V. 75. №. 5. P. 910-918.
62. Roostalu U., Kutuev I., Loogväli E.L. et al. // *Mol Biol Evol.* 2007. V. 24. № 2. P. 436-448.
63. Tambets K., Rootsi S., Kivisild T. et al. // 2004. *Am. J. Genet.* V. 74. P. 661-682.
64. Ingman M, Gyllensten U. // 2007. *Eur J Hum Genet.* V. 15. №. 1. P.115-20.
65. Behar DM, Hammer MF, Garrigan D et al. // *Eur J Hum Genet.* 2004 V. 12. № 5. P. 355-364.
66. Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G.A. et al. // *Hum Genet.* 2006. V. 118, № 5. P. 591-604.
67. Laitinen V., Lahermo P., Sistonen P., Savontaus M. // *Hum Hered.* 2002. V. 53, № 2. P. 68-78.
68. Lappalainen T., Koivumäki S., Salmela E. et al. // *Gene.* 2006. V. 376, № 2. P. 207-215.
69. Kayser M., Lao O., Anslinger K. et al. // *Hum Genet.* 2005. V. 117. P. 428-443.
70. Pericic M., Barac L.L., Martinovic K. I. et al. // *Croat Med J.* 2005. V.6, № 4. P. 502-13
71. Luca F., Di Giacomo F., Benincasa T. et al. // *Am J Phys Anthropol.* 2007. V. 132, № 1. P. 132-139.
72. Rootsi S., Magri C., Kivisild T. et al. // *Am J Hum Genet.* 2004. V. 75. P. 128-37.
73. Rootsi S., Zhivotovsky L.A, Baldovitch M. et al. // *Eur J Hum Genet.* 2007. V.15. P. 201-211.
74. Gray R., Atkinson Q. // *Nature.* 2003. V. 426. P. 435-438.
75. Mooijaart S., Berbee J., van Heemst D. et al. // *PLoS Medicine.* 2006. V.3, № 6. P. 874-883.
76. Luthra K., Prasad K., Kumarb P. et al. // *Clin. Genet.* 2002. V.62. P. 39-44.
77. Grody W.W. // *Annu. Rev. Med.* 2003. V.54. P.473-490.
78. Cidl K., Strelcova L., Vasku A. et al. // *Scr. Med. (Brno).* 1997. V.70. №2/3. P.81-87.
79. Лимборская С.А., Хуснутдинова Э. К., Балановская Е.В. Этногеномика и география народов Восточной Европы. М.: Наука, 2002. 261с.
80. Martinuzzi A., Sartori E., Fanin M. et al. // *Ann. Neurol.* 2003. V.53. №4. P.497-502.
81. Crisan D., Carr J. // *J. Mol. Diagn.* 2000. V.2. P.105-115.
82. Carluccio M., Soccio M., De Caterina R. // *Eur. J. Clin. Invest.* 2001. V31. P.476-488

В.С. Фадеев, Х.Р. Шимшилашвили, Д.В. Сотченков., Р.А. Комахин, М.М. Бабыкин¹,
В.В. Зинченко¹, И.В. Голденкова-Павлова

НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ РАСТЕНИЙ

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук,
Россия, г. Москва, 119991 ул. Губкина, 3

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

ВВЕДЕНИЕ

Для создания устойчивых форм растений используют стратегию, которая включает несколько этапов. Первоначально проводят поиск и отбор организмов, которые способны к росту и развитию в экстремальных условиях действия стрессовых факторов. Далее, идентифицируют и клонируют гены, продукты которых обеспечивают такую устойчивость, с последующей экспрессией клонированных генов в модельных организмах и проверкой их на устойчивость к стрессам. Положительные результаты дают основание использовать эти гены для получения устойчивых к стрессам хозяйственно-важных культур. Основные трудности при использовании этой стратегии, в большинстве случаев, связаны с определением белкового продукта исследуемого гена или его функциональной активности, поскольку большинство продуктов клонированных генов, либо не имеют ферментативной активности, либо их ферментативную активность можно определять, используя сложные методы исследования. Нами предложен новый подход для конструирования экспериментальных моделей с целью дальнейшего создания трансгенных растений, устойчивых к стрессовым факторам. Этот подход основан на конструировании гибридных генов, в которых целевой ген имеет трансляционное слияние с последовательностью репортерного гена, кодирующего термостабильную лихеназу. Эта репортерная система имеет ряд преимуществ.

Прежде всего, эта репортерная система обеспечивает использование более простых и чувствительных методов для анализа экспрессии гибридного гена, что позволяет проводить быстрый отбор трансгенных организмов, определять уровень экспрессии гибридных генов и молекулярные массы белковых продуктов гибридных генов [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Стандартные процедуры молекулярного клонирования выполняли согласно методическому руководству Маниатиса [2]. В работе использовали стандартные методы трансформации растений. Анализ экспрессии репортерного гена проводила по методам, разработанным ранее [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были сконструированы гибридные гены, содержащие репортерный ген термостабильной лихеназы, и следующие целевые гены:

1. гены *sd2* и *sd2mod*, кодирующие защитные пептиды, которые обладают антибактериальной и антигрибной активностью;
2. ген *recA*, продукт которого участвует в процессах рекомбинации.
3. ген *сгу3аМ*, который кодирует дельта-эндотоксин, обеспечивающий устойчивость растений к личинкам колорадского жука.
4. ген *prqA*, который контролирует устойчивость к индукторам окислительного стресса и некоторым токсическим соеди-

нениям, включая гербициды.

Далее, была изучена экспрессия этих генов в клетках модельных организмов про- и эукариот. Показано, что белки SD2 и SDmod в составе гибридных белков SD2-LicBM2 и SD2mod-LicBM2 оказывают такое же ингибирующее действие на рост грибов *Fusarium culmorum*, как нативный и модифицированный белки, а лихеназа сохраняет свои свойства – активность и термостабильность.

Показано, что гибридный белок RecA-LicBM2 сохраняет свойство RecA-белка связываться с оцДНК и предохранять ее от действия нуклеазы S1. Известно, что белок RecA *E.coli* стимулирует гомологичную рекомбинацию у растений. Это позволяет полагать, что экспрессия в растениях гибридного гена *recA-licBM2* также может изменить уровень и спектр рекомбинации у растений, обеспечивая при этом использование более простых и чувствительных методов для анализа экспрессии гибридного гена.

Сконструированы экспериментальные модели первичных трансформантов картофеля, экспрессирующие гибридный ген *cry3aM-licBM2*. Молекулярно биологический анализ и биотесты экспериментальных моделей позволяют предложить новую систему экспрессию *cry* генов в растениях. Эта система основана на экспрессии гибридных генов, в состав которых входит последовательность репортерного гена лихеназы, и использовании в качестве регуляторного элемента светоиндуцибельного промотора, который обеспечивает преимущественную экспрессию контролируемых генов только в зеленых тканях растения (листьях) – органах-мишенях для насекомых-вредителей. Показано, что *Cry3aM* белок в составе гибридного *Cry3a-LicBM2* белка сохраняет свою биологическую активность – инсектицидное действие на личинки колорадского жука. Показано, что экспрессия гибридного гена *prqA-licBM3* в клетки *Synechocystis* обуславливала у них значимое повышение устойчивости к метилвиологену.

ВЫВОДЫ

Использование термостабильной лихеназы как трансляционного репортера позволяет получать данные, которые трудно или невозможно получить с применением традиционных методов анализа экспрессии генов, что является важным при проведении фундаментальных и прикладных исследований. Основываясь на свойствах репортерного белка лихеназы, входящего в состав гибридных белков, представляется возможным использовать эту репортерную систему для мониторинга трансгенов в агроценозах, поскольку эта система является достаточно простой и точной, и не требует больших материальных и временных затрат.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (06-04-81009-Бел_а, 05-04-49186-а)

Список использованных источников

1. Р.А. Комахин, И.А. Абдеева, Г.Р. Салехи Джузани, И.В. Голденкова, А.А. Жученко. Термостабильная лихеназа как трансляционный репортер. Генетика. 2005. Т. 41, № 1. С. 31-40.
2. Маниатис Т., Фрич Э.Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 480.
3. Голденкова И.В., Мусийчук К.А., Пирузян Э.С. Бифункциональные репортерные гены: конструирование и экспрессия в клетках про- и эукариот. Молекулярная биология. - 2003. - Т. 37, № 2. С. 356-364

Дата поступления статьи 20 апреля 2007 г.

Н.А. Картель, С.В. Малышев, О.Ю. Урбанович, Т.В. Долматович

ДНК-МАРКЕРЫ В ГЕНЕТИКЕ И СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

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

На основе методов молекулярной генетики и генетической инженерии созданы принципиально новые подходы для глубокого изучения генетического аппарата живых организмов, что, в сочетании с методами классической генетики, позволяет получать совершенно новые представления о структурно-функциональной организации и регуляции экспрессии геномов у различных видов организмов.

Благодаря открытию Ботштейном в 1980 году явления «полиморфизма длины рестриционных фрагментов» (ПДРФ) [1], а позже в 1986 году «полимеразной цепной реакции» (ПЦР) Мюлисом [2] появилась реальная возможность изучать наследование определенных фенотипических признаков в их связи с конкретными последовательностями ДНК, идентифицировать индивидуальные особенности организмов на молекулярном уровне.

В основе ПДРФ анализа лежит полиморфизм в структурной организации ДНК эукариот. В основе ПЦР - фундаментальный генетический процесс репликации ДНК, когда для синтеза новой цепи ДНК в качестве матрицы используется одна из цепей дуплексной ДНК и олигонуклеотид (праймер) в качестве заправки.

ПДРФ анализ позволяет маркировать практически любой участок хромосомы и картировать гены, отвечающие не только за качественные, но и количественные (QTL) признаки. Для осуществления ПДРФ анализа необходимы зонды или ДНК-маркеры. В качестве зондов могут быть использованы последовательности уже известных генов, к - ДНК, неидентифицированные фрагменты ДНК, а также микросателлитные или короткие повторяющиеся последовательности ДНК.

Исключительно ценным для исследований геномов как высших, так и низших

организмов является метод ПЦР-анализа, для осуществления которого требуются праймеры (синтезируемые короткие последовательности ДНК, гомологичные амплифицируемой ДНК). В зависимости от типа используемых праймеров, условий ПЦР, гель-электрофореза и способа визуализации результатов выделяют много типов маркеров: произвольно амплифицированная полиморфная ДНК – RAPD, полиморфизм длины амплификационных фрагментов – AFLP, охарактеризованный секвенированием амплифицированный-район – SCAR, повторы простых последовательностей – SSR, маркеры на основе ретротранспозонов – IRAP и REMAP и другие [3].

Наиболее широкое распространение получили два типа маркеров RAPD и SSR. Хотя в последнее время все большее распространение получают SNP маркеры, имеющие максимально возможную встречаемость в геноме. RAPD метод характеризуется одновременным анализом большого количества локусов и основан на использовании единичных произвольных праймеров.

При использовании SSR необходимо иметь два праймера, ограничивающих микро-сателлитные последовательности. Методы ПДРФ и ПЦР анализов сейчас успешно и очень интенсивно используется в самых различных направлениях и областях биологической науки.

В отношении растений это:

- создание молекулярно генетических карт сельскохозяйственных и других растений;

- определение филогенетических связей между культурными растениями и их дикими родственниками (вопросы систематики);

- выявление доноров агрономически важных признаков;
- сертификация партий семян;
- определение генетической частоты линий и сортов;
- определение связей между сортами и их происхождением;
- маркирование генов устойчивости к болезням и другим, биотическим и абиотическим факторам;
- ДНК-маркер сопутствующий отбор.

Одним из важнейших направлений использования ПДРФ и ПЦР методов является создание молекулярно генетических карт растений. Такие карты позволяют более глубоко исследовать структурную организацию геномов, локализовать моно- и полигенные локусы, клонировать

отдельные гены, анализировать мутации, контролировать уровень гомо- и гетерозиготности, проводить сравнительный анализ сцепления генов у различных видов растений и др. (2).

Основой конструирования генетических карт растений является создание соответствующих популяций и подбор полиморфных зондов-маркеров. Процесс создания карт, основанных на ПДРФ маркерах, включает несколько этапов (Рис. 1).

Нами совместно с учеными из Института генетики и растениеводства (Гагерслебен, Германия) и кафедры Санкт-Петербургского Университета (Россия) была разработана интегрированная молекулярно-генетическая карта ржи, высоконасыщенная молекулярными маркерами [4]



Рис. 1. Схема создания генетических карт растений

Для построения базовой генетической карты генома ржи были созданы 2 F₂ популяции путем реципрокного скрещивания

двух ржаных инбредных линий P87 и P105. Карта охватывает все 7 хромосом, составляет 1050 CM и включает 153 RFLP

маркера, 60 кДНК и геномных праймеров пшеницы, 7 геномных праймеров *Aegilops taushii*, 53 кДНК и геномной ДНК ячменя, 12 микросателлитов пшеницы и ржи, 14 изоферментных маркеров и 30 маркеров геномной ДНК ржи, из которых 11 создано нами на основе геномной библиотеки ДНК ржи, обогащенной низкокопийными последовательностями [5,6]. Остальные маркеры были любезно предоставлены нам из различных научных учреждений Германии, США и Великобритании.

В последние годы нами картировано около 112 микросателлитных локусов, которые могут использоваться для локализации отдельных генов и локусов количественных признаков [7].

Созданная карта сцепления и указанные выше популяции, были использованы для картирования индивидуальных генов, контролирующих ряд морфологических и агрономически ценных генов. Среди них гены, контролирующие высоту растений (*np*, *ct1*, *ct2*, *Ddw1*), гены самофертильности (*S*, *Z*, *S5*), ген восстановления мужской фертильности (*Rfg1*), гены контролирующие 75K γ -секалины (*Sec2* и *Sec5*), образования воскового налета (*Wal*), безлигульность (*al*) и др. Всего картировано 18 генов [8]. В последнее время совместно с исследователями из Санкт-Петербургского Университета мы проводили работу по карти-

рованию асинаптических генов у ржи с использованием SSR и изоферментных маркеров. Как известно, эффективность решения такой важной селекционной задачи, как повышение генетического разнообразия с/х. культур, напрямую связана с возможностью управления процессом генетической рекомбинации. Одним из подходов к решению этой задачи является управление процессом мейоза. Однако степень изученности данного процесса, в котором участвует множество мейоз-специфических генов, пока недостаточна.

Изучение фенотипической экспрессии мейотических мутантов, в т.ч., и ржи, их картирование позволяет дифференцировать различные этапы мейоза, выявить эффекты мутаций. Сотрудниками кафедры генетики СПбГУ (Соснихиной С.П. и др.) в процессе изучения мейоза синоптических мутантов ржи было выявлено несколько групп мутантов с различными нарушениями в формировании синаптического комплекса (Табл. 1):

- мутации сильного асинапсиса (*sy1* и *sy9*) с высоким числом унивалентов в мейозитах в метафазе I;
- мутации слабого синапсиса или десинапсиса (*sy3*);
- мутации негомологичного синапсиса (*sy2*, *sy6*, *sy7*, *sy8*, *sy9*, *sy19*)

Таблица 1

Характеристика синаптических мутантов ржи

| Генотип | Эффект | Среднее число унивалентов на мейоцит | Фенотип в МI | Фенотип СК |
|-------------|-------------------------|--------------------------------------|---|---|
| wild-type | Синапсис | 0.3 | Биваленты |  |
| <i>sy1</i> | Асинапсис | 13.9 | Униваленты |  |
| <i>sy9</i> | Асинапсис | 12.3 | Униваленты |  |
| <i>sy10</i> | Гетерологичный синапсис | 6.7 | Униваленты, биваленты |  |
| <i>sy18</i> | Нарушение синапсиса | 6.6 | Униваленты, биваленты | не изучен |
| <i>sy19</i> | Гетерологичный синапсис | 12.6 | Униваленты, Редко биваленты, хромосомные ассоциации |  |

Чтобы картировать некоторые из указанных генов на первом этапе скрещивали фертильные растения из семей, расщеп-

ляющихся по синаптическим мутациям с линиями с нормальным мейозом. Затем проводили скрининг гибридов F₂ на вы-

щепление стерильных растений – предполагаемых гомозигот по синаптической мутации. На третьем этапе у отобранных F₂ потомств проводили цитологический анализ мейоза, выделение ДНК и анализ расщепления по SSR и изоферментным маркерам (MAPMAKER). Материалом для исследований послужили инбредные линии Mc1 из сортовой ржи, Mc9 и Mc19 из сорта Вятка, расщепляющиеся по мутациям *sy1*, *sy9* и *sy19*, соответственно. Для изучения полиморфизма было использовано 40 SSR и 2 изоферментных маркера *Sod2* и *Aat2*. Проведенные исследования позволили картировать на генетической

карте ржи 5 асинаптических гена: ген *sy1* – в центромерном районе хромосомы 7R, ген *sy9* – в центромерном районе хромосомы 2R, ген *sy18* – на коротком плече хромосомы 2R, ген *sy19* – на длинном плече хромосомы 7R и ген *sy10* – на дистальном конце длинного плеча хромосомы 5R (Рис. 2).

Таким образом, использование молекулярных маркеров позволило локализовать на генетической карте ржи 5 впервые описанных мейотических генов, что открывает перспективы для их клонирования и дальнейшего изучения.

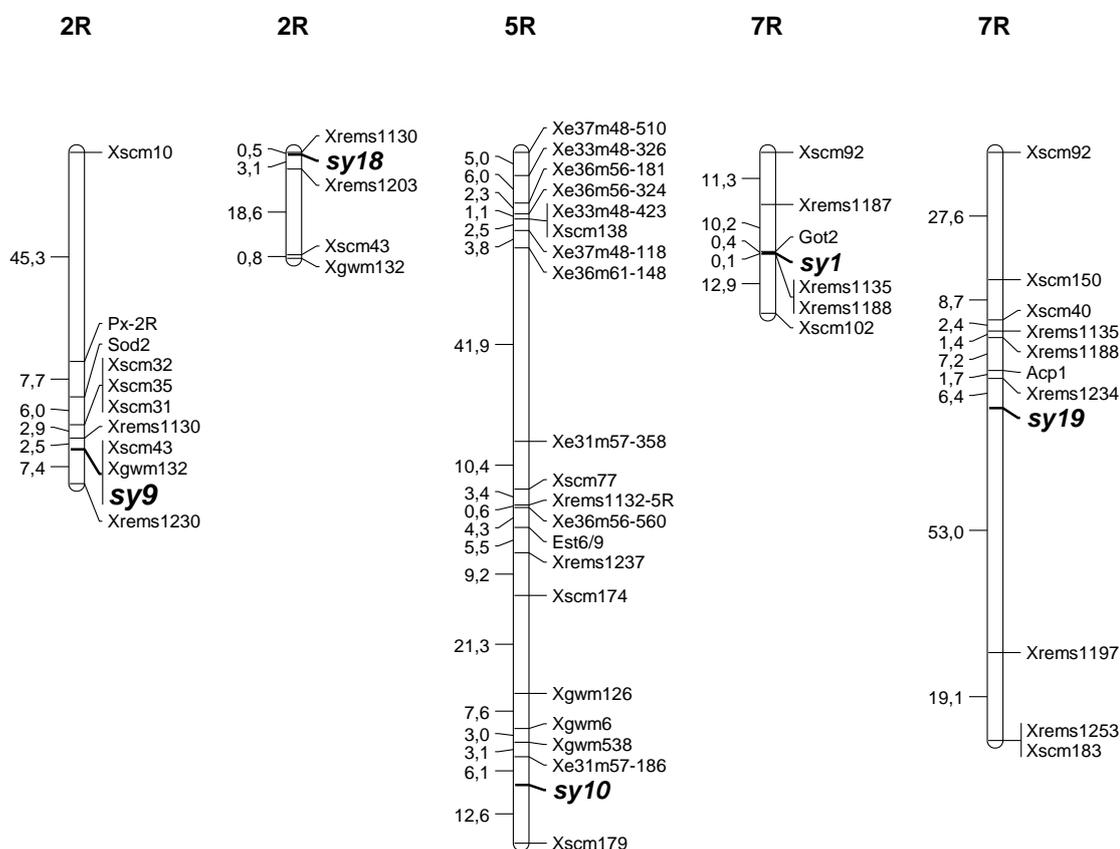


Рис. 2. Картирование синаптических мутаций у ржи

Следует также отметить, что генетическая карта является хорошей основой

для картирования локусов количественных признаков ржи (QTL).

Впервые анализ некоторых количественных признаков у ржи был проведен нами в 1999 году совместно с учеными из Гатерслебена (Германия) и Санкт-Петербурга с использованием одной 5R хромосомы.

В последующем были созданы межлинейные F2 популяции от скрещивания линий № 6 (сорт Сталь), №2 (образец Ветвистоколосая) и №7 (сорт Вятка). Популяции 6x2, 7x2 и 6x7, состоящие из 90 растений были выращены и проанализированы по 17 признакам. С помощью 51 ПДРФ маркера были построены генетические карты сцепления. Для всех 17 изученных

признаков были выявлены QTL локусы хотя бы в одной из трех популяций. Количество локусов, обнаруженных для отдельных признаков, в каждой популяции колебалось от 0 до 4. В среднем для каждого признака было найдено по 2 локуса. Наибольшее число локусов найдено для признаков NPT, LMS и NKFWP, а наименьшее для признаков NUT и MSWP [9].

Наряду с созданием генетических карт молекулярные маркеры в сочетании с ПЦР анализом позволяют осуществлять генотипирование отдельных генов, например, в сортах с/х культур, имеющих хозяйственное значение.

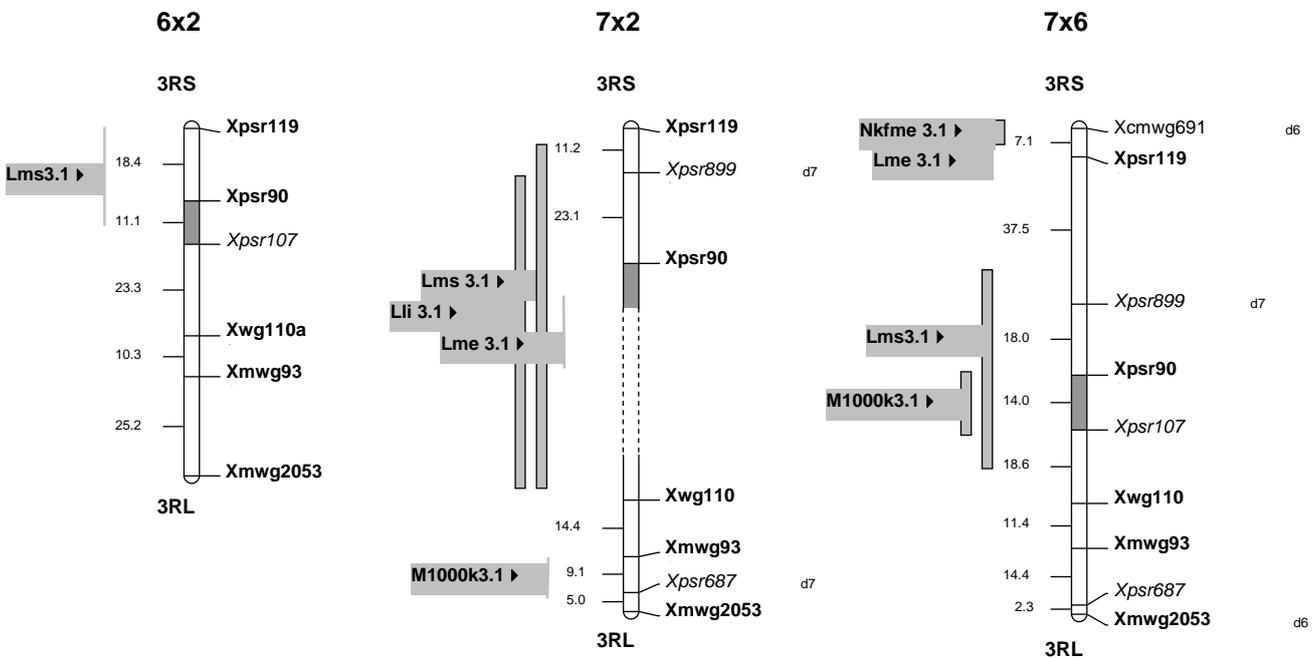


Рис. 3. Генетические карты 3R хромосомы для 3 популяций ржи, показывающие позиции картированных QTL локусов (Lli - длина верхнего междоузлия, Lms - длина главного побега, Nkfme - масса зерна на главном колосе, Lme - длина главного колоса, M1000k - масса 1000 зерен

Одним из важных направлений селекции является создание высокопродуктивных полукарликовых сортов мягкой пшеницы с повышенной устойчивостью к полеганию. К настоящему времени описан 21 *Rht* (*reduced plant height*) ген, определяющий признак низкостебельности. Большинство этих генов хорошо изучено и кар-

тированы на хромосомах. При создании нового низкостебельного сорта селекционеру важно знать, имеются ли в исходном материале гены короткостебельности. Для этого достаточно провести скрининг интересующих селекционера сортов или линий с помощью молекулярных маркеров (Рис. 4)

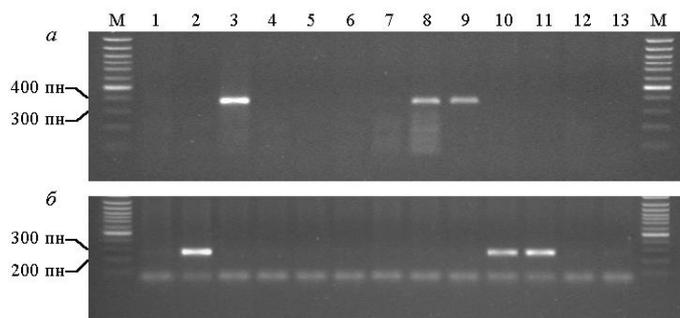


Рис. 4.
PCR амплификация генов *Rht-B1b* (а) и *Rht-D1b* (б). 1 – Apollo; 2 – Lerma Rojo 64; 3 – Rendezvous; 4 и 5 – Легенда; 6 и 7 – Сузорье; 8 и 9 – Пошук; 10 и 11 – Узлет, 12 и 13 – Поэзия. М – маркер GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

Мы проводили идентификацию трех наиболее важных генов короткостебельности (*Rht-B1b*, *Rht-D1b* и *Rht8*) у 20 сортов озимой пшеницы, созданных в Институте земледелия и селекции НАНБ, используя для этого STS и SSR маркеры. Оказалось, например, что ген *Rht-B1b* выявлен только в одном сорте Пошук, а ген *Rht-D1b* в двух сортах Спектр и Узлет. Ген *Rht8* (аллель 192 п.н. SSR маркера *Xgwm261*) был обнаружен в 7 белорусских сортах (35%).

Анализ родословной белорусских сортов Узлет, Спектр и Пошук показывает, что два первых получили ген *Rht-D1b* от немецкого сорта Bontaris, который в свою очередь через родительский сорт Taras связан с американским сортом Gaines.

Пошук получен от скрещивания украинских сортов (Мироновская 808 улучшенная и Донецкая 79) и мексиканского сорта Siete Cerros 66, от которого унаследовал ген *Rht-B1b*.

Нами также осуществлено генотипирование запасных белков и пуриноидинов, отвечающих за твердозерность в сортах пшеницы белорусской селекции. Как известно, важнейшими факторами качества муки являются нерастворимые в воде белки – глютеины, которые кодируются гомеологическими хромосомами группы 1 и, главным образом, ответственны за свойства упругости и растяжимости пшеничного теста. Запасные белки семян, ответственные за образование пшеничного глютена состоят из двух главных фракций: глиадинов и глютеинов. Глиадины – это мономерные белки, подразделяющиеся на 4

группы: альфа, гамма, бета и омега. Глютеины – это мультимерные комплексы, состоящие из субъединиц высокого (HMW) и низкого (LMW) молекулярного веса, связанные вместе дисульфидными связями. Глиадины и HMW глютеины кодируются генами в *Gli-1* локусах, а LMW глютеины кодируются генами в *Glu-3* локусах, которые тесно сцеплены с локусом *Gli-1*. Каждый *Glu-1* локус состоит из двух тесно сцепленных генов, кодирующих глютеины х- и у-типа. В каждом из глютеиновых генов существует аллельная вариация, и в ряде исследований показано, что состав аллелей значимо влияет на свойства пшеничного теста. Так, субъединицы HMW глютеинов 1Dx5-1Dy10 положительно влияют на упругость теста и улучшают хлебопекарные свойства, тогда как субъединицы 1Dx2-1Dy12 связаны с низкими хлебопекарными качествами. Среди низкомолекулярных глютеинов также есть аллели, благоприятно влияющие на качество муки (bbb и bbs композиции локуса *Glu-3*) и аллели, снижающие качество муки (*Glu-A3e*, *Glu-B3c*, d, g).

Для анализа аллельной композиции глютеинов обычно используется метод SDS полиакриламидного гелеэлектрофореза. Однако этот метод достаточно трудоемок и, что главное, он не обладает достаточной разрешающей силой, чтобы достоверно отличить аллели HMW и, особенно, LMW-глютеинов, что не позволяет использовать его во многих селекционных программах.

Мы применили метод ПЦР-диагностики на основе ДНК-зондов, в частности, были использованы STS маркеры, которые специфично амплифицируют отдельные наиболее ценные аллели локуса *Glu-1*. С помощью данного метода было проанализировано 20 сортов озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) из созданных в Институте земледелия и селекции НАН Беларуси.

Как оказалось, только сорт Капылянка обладает хорошим сочетанием аллелей высокомолекулярных глютенинов, придающим муке высокие хлебопекарные качества. Все остальные проанализированные сорта содержат аллели генов, отрицательно сказывающиеся на качестве муки. Анализ родословных белорусских сортов по локусам HMW глютенинов показывает, что, как правило, в скрещиваниях принимал участие сорт, обладающий высокими хлебопекарными качествами, и сорт с не-

гативными аллелями по генам запасных белков, но имеющий другие ценные селекционные признаки. При последующем анализе гибридного материала вероятно отбор на качество муки не производился, что и сказалось на генотипах созданных сортов. Предлагаемый нами метод может существенно улучшить ситуацию при использовании его в селекционной работе с пшеницей.

Другим важным показателем для пшеницы является твердозерность, которая зависит от экспрессии двух генов пуриноидинов, расположенных на хромосоме 5D. Продукты этих генов (*Pina-D1* и *Pinb-D1*) образуют белок фриабиллин – (15 кДа), который располагается на поверхности крахмальных зерен. Аллельный состав этих двух генов определяет свойства твердозерности или мягкозерности (Табл.2)

Таблица 2

Аллельные варианты генов пуриноидинов

| Аллель гена <i>Pina-D1</i> | Аллель гена <i>Pinb-D1</i> | Фенотип, мутация |
|----------------------------|----------------------------|--|
| <i>Pina-D1a</i> | <i>Pinb-D1a</i> | Мягкозерная, дикий тип |
| <i>Pina-D1b</i> | <i>Pinb-D1a</i> | Твердозерная, пуриноидин a, null |
| <i>Pina-D1a</i> | <i>Pinb-D1b</i> | Твердозерная, пуриноидин b, GGC → AGC, Gly-46 to Ser-46 |
| <i>Pina-D1a</i> | <i>Pinb-D1c</i> | Твердозерная, пуриноидин b, CTG → CCG, Leu-60 to Pro-60 |
| <i>Pina-D1a</i> | <i>Pinb-D1d</i> | Твердозерная, пуриноидин b, TGG → AGG, Trp-44 to Arg-44 |
| <i>Pina-D1a</i> | <i>Pinb-D1e</i> | Твердозерная, пуриноидин b null, TGG → TGA, Trp-39 to stop codon |
| <i>Pina-D1a</i> | <i>Pinb-D1f</i> | Твердозерная, пуриноидин b null, TGG → TGA, Trp-44 to stop codon |
| <i>Pina-D1a</i> | <i>Pinb-D1g</i> | Твердозерная, пуриноидин b null, TGC → TGA, Cys-56 to stop |

В случае присутствия в обоих генах нормальных аллелей дикого типа (*Pina-D1a* и *Pinb-D1a*) пшеница является мягкозерной. Если хотя бы один из этих генов является мутантным (аллели *Pina-D1b* и *Pinb-D1b, c, d, e, f, g*), пшеница приобретает твердозерность. Существующие методы

определения твердозерности пшеницы по физическим свойствам муки крайне трудоемки и малопригодны для использования в селекционном процессе. С помощью же метода ПЦР диагностики с использованием ДНК-маркеров определение этого показателя резко упрощается (Рис. 5)

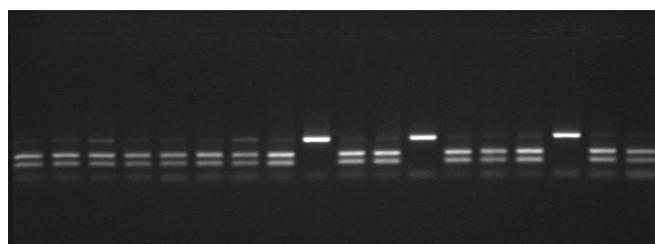


Рис. 5. PCR-генотипирование аллели *Pinb-D1c*. PCR-продукт размером 447 пп рестрицируется *Brs*VI. В присутствии твердозерной аллели *Pinb-D1c* наблюдается фрагмент длиной 447 пп.

Мы провели ПЦР-генотипирование указанных выше сортов пшеницы по признаку твердозерности. 12 сортов несут мутантный аллель *b*, придающий им твердозерность (Надзья, Сузорье и др.); 3 сорта (Гармония, Каравай, Щара) несут аллели дикого типа и, следовательно, относятся к мягким пшеницам; 5 сортов (Санта, Премьера, Завет, Эпопея и Мелодия) проявляют высокую гетерогенность и, вероятно, представляют собой расщепляющиеся популяции по гену твердозерности. Следовательно, для улучшения хлебопекарных качеств этих сортов необходим дополнительный отбор на однородность.

Приведем еще пример эффективного применения ДНК маркеров в диагностических целях – определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы. Бурая или листовая ржавчина – одна из основных болезней пшеницы. Она вызывается грибом *Puccinia triticina* и может приводить к значительным потерям урожая (10-30%) и снижению качества зерна.

Наиболее экологически безопасный способ защиты сортов пшеницы от поражения бурой ржавчиной – введение в них *Lr* генов устойчивости. К настоящему времени описано более 50 *Lr* генов, расположенных на разных хромосомах пшеницы. *Lr* гены имеют разную эффективность в отношении устойчивости к болезни. Поэтому при создании сортов важно знать, какие гены имеются в исходном материале, включаемом в селекционный процесс.

В настоящее время отдельные гены уже можно идентифицировать с помощью молекулярных маркеров. Нами было проанализировано 68 сортов мягкой пшеницы различного происхождения на присутствие в их генотипе генов: *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr21*, *Lr24*, *Lr26* и *Lr34* [10].

Некоторые *Lr* гены не выявлены ни в одном сорте, другие же (кроме *Lr1*) встречаются довольно редко. Среди изученных

наибольший интерес представляет ген *Lr34*. Он не является расоспецифичным, обеспечивает общую устойчивость к бурой ржавчине на протяжении вегетационного периода у взрослых растений. Его присутствие повышает общую устойчивость сортов пшеницы к различным патотипам патогенна.

Ген *Lr34* (аллель 254 п.н. SSR маркера *Xgwm295*) был выявлен у 18 сортов, в т.ч., у 4 белорусских (Мелодия, Злата, Поэзия и Фантазия) [10].

Хозяйственный интерес представляет также ген *Lr26*, перенесенный в пшеницу из короткого плеча хромосомы 1R ржи вместе с еще тремя генами: *Sr31* (устойчивость к стеблевой ржавчине), *Yr9* (устойчивость к желтой ржавчине) и *Pm8* (устойчивость к мучнистой росе). Таким образом, молекулярный маркер к гену *Lr26* выявляет все 4 гена одновременно, а сорта, содержащие эти гены, оказываются устойчивыми к нескольким болезням. Интересно отметить, что ген *Lr26* выявлен в тех же белорусских сортах, что и ген *Lr34* [10].

Особую ценность представляют молекулярные маркеры в селекции многолетних растений, как, например, плодовых. Нами начаты работы по выявлению генов устойчивости к болезням у яблони. В частности, проведен поиск генов устойчивости к парше у 40 сортов яблонь различного происхождения. Как известно, парша наносит большой урон урожаю яблонь, поражает листья, побеги, цветы и плоды. Одним из источников устойчивости яблонь к парше является ген *Vf*, идентифицированный в дикой яблоне *Malus floribunda* клон 821. Для выявления данного гена в сортах было использовано два SCAR маркера – *VfC1E* и *VfC2R*. Анализ результатов показывает, что большинство сортов несут ген *vf* в гомозиготном рецессивном состоянии и, следовательно, неустойчивы к парше [11] (Рис.6).

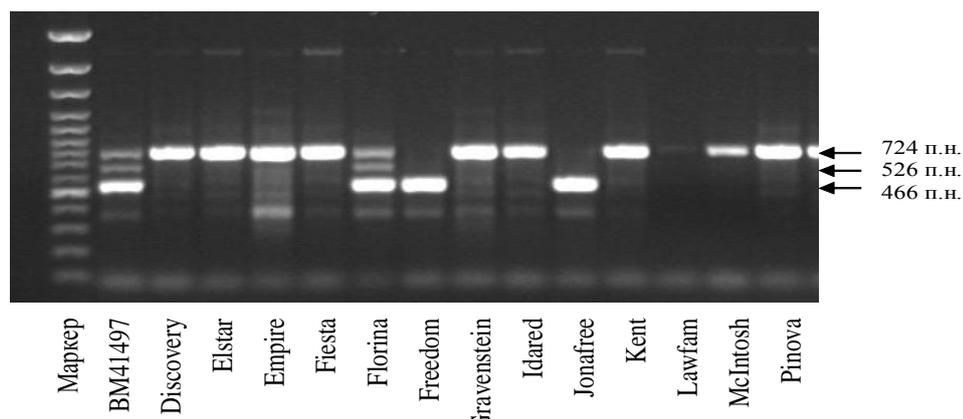


Рис. 6. Результаты разделения методом электрофореза в 1% агарозном геле продуктов амплификации ДНК сортов яблони с праймерами AL07 и AM19. В качестве маркера использовали 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Фрагмент длиной 466, 526 п.н. соответствует доминантному гену *VfVf*, длиной 466, 526, 724 п.н. - *Vfvf*, длиной 724 п.н. - *vfvf*.

Среди белорусских сортов имеются шесть (Белорусское сладкое, Дарунак, Имант, Надзейны, Память Коваленко и Пспех), содержащих *Vf* ген в гетерозиготном состоянии. Эти сорта можно отнести к устойчивым, и они могут использоваться как источники данного гена в селекционных программах [11].

Сравнение научных результатов с родословной сортов яблони позволило определить, что источником гена *Vf* в сортах белорусской селекции был элитный отбор шведской селекции BM41497, который, в свою очередь, унаследовал ген от *M. floribunda* 821 [11].

Среди проблем, решаемых с помощью молекулярных маркеров, важное место занимает проблема паспортизации сортов сельскохозяйственных культур и сертификации партий семян. Идентификация или генетическая, биохимическая и морфологическая характеристика сортов, линий и гибридов растений является неотъемлемым элементом селекции и семеноводства. Как известно, сорту представляется правовая охрана, если он обладает новизной, отличимостью, однородностью и стабильностью. Тест на отличимость, однородность и стабильность – ООС-тест базируется на технических характеристиках, утвержденных Между-

народным союзом по охране новых сортов растений (UPOV).

В настоящее время методы по идентификации сортов сельскохозяйственных культур базируются на оценке ряда морфологических признаков и биохимических (белковых) маркеров. Однако эти методы идентификации имеют ряд недостатков, среди которых наиболее важным является его недостаточная точность.

Методы, основанные на использовании ДНК-маркеров, обладают рядом преимуществ:

- молекулярные методы можно применять на любых стадиях развития растения;
- экспрессия ДНК-маркеров не зависит от условий окружающей среды;
- дают высоко воспроизводимые результаты и незаменимы в спорных случаях, когда применение традиционных подходов не позволяет достоверно различить исследуемые образцы;
- для проведения анализа достаточно небольшого количества биологического материала (≈ 50 мг);
- анализ выполняется в лабораторных условиях в течение 5-7 дней и не требует полевого испытания материала, и др.

Работы по использованию ДНК-маркеров для идентификации и паспортизации активно ведутся сейчас во многих странах. Актуальна эта проблема и для Беларуси.

Метод идентификации генотипов с помощью SSR маркеров основан на определении длины повторяющихся последовательностей у отдельных образцов растений. По сравнению с другими типами ДНК-маркеров, система SSR маркеров имеет высокую разрешающую способность, дает результаты, стабильно воспроизводимые в различных лабораториях, характеризуется высоким уровнем стандартизации и поддается автоматизации.

Нами разработаны методические рекомендации по идентификации и паспортизации с помощью молекулярных маркеров сортов с/х культур на примере сортов мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы [12].

В качестве примера приведем здесь паспорт сорта картофеля Лазурит:

A_{180,190} B₁₉₀ D₁₉₈ E₁₇₁ F_{260,264} G_{173,236} H_{89,114} I_{170,189} J_{143,159} K_{167,172} L_{184,191} M₁₄₀ N_{71,79} O₁₁₉, а также сорта мягкой пшеницы Былина:

A₁₂₃ B₁₁₈ C₁₄₁ F₁₉₀ G₂₃₅ H₁₄₉ I₁₇₉ J₁₆₀ K₁₉₆ L₇₉ M₂₀₂ N₁₄₂ O₁₁₃ P₁₈₂ Q₁₁₇ R_{null} S₁₄₉ T₁₁₅ U₁₈₃ W₂₄₆

Как видим, разработка и использование технологии SSR-ПЦР анализа растений позволяют решать очень важную для селекции задачу – давать высокоточную объективную характеристику генотипа сорта, т.е., генетический или ДНК-паспорт сорта в виде формул. Наряду с этим, метод позволяет осуществлять проверку генетической чистоты сортов и инбредных линий, оценивать уровень гибридности материала.

Использование метода ДНК паспортизации сортов с/х культур позволит сэкономить средства, расходуемые на закупку некондиционного сортового материала с высокой несортовой примесью, повысить эффективность контроля за

создаваемыми в республике сортами и качество селекционного процесса в селекционных учреждениях РБ, улучшить систему патентования новых сортов.

Таким образом, ДНК-маркеры уже становятся неотъемлемым элементом селекционного процесса при создании новых сортов как на этапе подбора исходных источников для гибридизации, так и в последующем анализе гибридного материала. Возник новый уровень селекции и термин – «ДНК-маркер сопутствующий отбор»

Список использованных источников

1. Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *Am. J. Hum. Genet.*– 1980.– V. 32.– P. 314–331.
2. Mulis K. B., Faloona F. A., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*– 1986.– V. 51.– P. 263– 273.
3. Малышев С. В., Картель Н. А. Молекулярные маркеры в генетическом картировании растений // *Молекулярная Биология.*– 1997.– Т. 31.– С. 197–208.
4. Korzun V., Röder M., Ganai M. W., Worland A. J., Law C. N. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.*– 1998.– V. 96.– P. 1104– 1109.
5. Korzun V., Kartel N., Plaschke J., Börner A. Construction and screening of a rye DNA library for RFLP mapping // *Cereal Res. Commun.*– 1994.– V. 22.– P. 151–157.
6. Korzun V., Malyshev S., Voylokov A. V., Börner A. A genetic map of rye (*Secale cereale* L.) combining RFLP, isozyme, protein, microsatellite and gene loci // *Theor. Appl. Genet.*– 2001.– V. 102.– P. 709–717.
7. Khlestkina E. K., Than M. H. M., Pestsova E. G., Röder M. S., Malyshev S.

V., Korzun V., Börner A. Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequence tags // *Theor. Appl. Genet.*— 2004.— V. 109.— P. 725–732.

8. Малышев С. В., Войлоков А. В., Корзун В. Н., Бёрнер А., Картель Н. А. Картирование генома ржи (*Secale cereale* L.) с помощью молекулярных маркеров // *Вестник ВоГиС.*— 2005.— Т.9.— С. 473—480

9. Malyshev S. V., Kartel N. A., Voylovkov A. V., Korzun V., Börner A. Comparative analysis of QTLs affecting agronomical traits in rye and wheat // *EWAC-News.*— 2003.— V. 12.— P.120–122.

10. Урбанович О. Ю., Малышев С. В., Долматович Т. В., Картель Н. А. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием молекулярных маркеров // *Генетика.*— 2006.— Т. 42.— С. 1–9.

11. Урбанович О. Ю., Малышев С. В., Козловская З. А., Картель Н. А. Современные молекулярные методы выявления генов устойчивости к патогенам в геноме яблони // *Плодоводство: науч. тр.: ч.2.: Методическое обеспечение устойчивого развития современного плодводства: материалы междунар. науч. конф., Самохваловичи, 6-8 сент. 2006 г. / Ин-т плодводства НАН Беларуси: редкол.: В.А. Матвеев (гл.ред.) [и др.].— Самохваловичи, 2006.— Т. 18, ч. 2. — С. 62—67.*

12. Малышев С. В., Урбанович О. Ю., Картель Н. А. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК-маркеров // *Методические рекомендации, Минск, 2006. - 37 с.*

Дата поступления статьи 29 октября 2007 г.

А.П. Ермишин

ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ОЦЕНКИ РИСКА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ (ОБЗОР)

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

Использование достижений современной биотехнологии (генетической инженерии) имеет два важных аспекта. С одной стороны, очевидно, что она может в значительной мере содействовать решению мировых проблем благосостояния людей, касающихся, в первую очередь, насущных потребностей в продуктах питания, эффективного ведения сельского хозяйства и совершенствования здравоохранения. С другой стороны, неконтролируемое создание генно-инженерных организмов (далее ГИО) и высвобождение их в окружающую среду может нанести вред здоровью человека, привести к неблагоприятным экологическим последствиям [1]. Таким образом, одним из главных международных требований, связанных с развитием и применением биотехнологии в науке и производстве, является безопасность проведения исследований, полевых и других испытаний ГИО, а также биобезопасность при помещении на товарный рынок продуктов генно-инженерной деятельности (далее ГИД), обладающих новыми желательными признаками. Под биобезопасностью в данном контексте понимается система мероприятий, направленных на предотвращение или снижение до безопасного уровня неблагоприятных воздействий ГИО на здоровье человека и окружающую среду при осуществлении генно-инженерной деятельности.

Международная структура биобезопасности и структура биобезопасности отдельных государств включают в себя ряд основных компонентов. Во-первых, к ним относится законодательная база, регули-

рующая ГИД. Во-вторых — административная система, исполняющая, контролирующая законный порядок осуществления ГИД. В-третьих — система обоснованного принятия решений, которая включает оценку и предупреждение соответствующего риска ГИД (управление риском ГИД). И, наконец, механизм информирования и участия общественности в принятии решений о разрешении ГИД и контроле над их исполнением. В настоящем сообщении предполагается рассмотреть базовые принципы и основные методы, применяемые при оценке риска генно-инженерной деятельности.

1. Понятия «риск», «фактор риска», «оценка риска»

В понятие «риск» люди вкладывают различный смысл в зависимости от своего социального, культурного, финансового положения и значимости в обществе [2]. По наиболее общему определению, риск — это вероятность нежелательного события. Понятно, что риск нежелательного события связан с какими-то определенными особенностями используемых человеком веществ или совершаемых действий. Каждое вещество и деятельность являются потенциальными факторами риска. Одни вещества и виды деятельности способны вызывать сразу ряд неблагоприятных событий различного рода, в то время как другие могут вызывать единичные или немногочисленные виды таких событий. Фактор риска — это свойственная веществу или какой-либо деятельности (процессу) потенциальная способность причинять вред (вызывать нежелательное событие) [3, 4]. Фактор риска — функция неблаго-

приятных свойств объекта (деятельности, процесса) и условий их проявления. Если понятие «фактор риска» обозначает, таким образом, лишь причину (сущность) потенциального неблагоприятного события, то понятие «риск» обозначает расчетную вероятность реализации этого события с теми или иными масштабами его последствий. В соответствии с этим риск можно определить математическим выражением:

риск = вероятность негативного воздействия фактора риска × величина последствий воздействия [2].

В отношении генно-инженерной деятельности термином «фактор риска» определяют потенциально возможные прямые и опосредованные неблагоприятные воздействия ГИО или продуктов, изготовленных из ГИО (включающих ГИО), на здоровье человека и (или) окружающую среду, обусловленные эффектом вставки рекомбинантной ДНК, функционирования трансгенов и передачей трансгенов от ГИО другим организмам [4, 5]. Под прямым воздействием понимается первичное воздействие ГИО как такового на здоровье человека и среду, не требующее анализа цепи взаимосвязанных событий. Под непрямым воздействием понимают опосредованное воздействие ГИО на здоровье человека и окружающую среду, которое осуществляется через цепь взаимозависимых событий. В частности, оно может проявляться вследствие взаимодействия ГИО с другими организмами; вследствие переноса генетического материала от ГИО другим организмам; в результате изменений порядка эксплуатации объектов хозяйственной деятельности и управления ими, обусловленных высвобождением ГИО, и т.д. Немедленное воздействие ГИО на здоровье человека и окружающую среду наблюдается непосредственно в период осуществления ГИД. Оно также может быть прямым и непрямым. Отдаленное воздействие становится очевидным в виде прямого или непрямого после окончания данной ГИД.

Среди потенциальных рисков для здоровья человека, связанных с использованием генно-инженерных организмов, рассматриваются такие, как синтез новых для реципиентного организма белков продуктов трансгенов, которые могут быть токсичными и/или аллергенными; изменение активности отдельных генов живых организмов под влиянием вставки чужеродной ДНК, в результате которого может произойти ухудшение потребительских свойств продуктов питания, получаемых из этих организмов; горизонтальная передача трансгенов другим организмам, в частности, маркерных генов устойчивости к антибиотикам от генетически модифицированных организмов (ГМО) микроорганизмам пищеварительного тракта.

В качестве потенциальных неблагоприятных последствий высвобождения генно-инженерных организмов в окружающую среду рассматривают изменение естественных биоценозов в результате переноса трансгенов диким видам, появление новых, более агрессивных патогенов, сорняков, поражение организмов, не являющихся мишенями трансгенных признаков и др.

2. Принцип принятия мер предосторожности

Одним из важнейших принципов биобезопасности является принцип принятия мер предосторожности. Источники появления и применения этого принципа проистекают из экологического общественно-го движения 70-х годов прошлого века, когда он был сформулирован как реакция на скептицизм относительно возможности научной оценки риска и предотвращения вредных последствий применения сложных технологий [6]. По сути, принцип определяет, что перед лицом научной неопределенности или отсутствия необходимых знаний лучше ошибиться в сторону избыточности мер безопасности по отношению к здоровью человека и окружающей среде, чем ошибиться в оценке риска [7]. Принцип принятия мер предосторожности впервые сформулирован в междуна-

родном соглашении в рамках «Мировой природной хартии» (World Charter for Nature), принятой Генеральной Ассамблеей ООН в 1982 году. С этого времени он присутствует во многих международных документах и договорах, касающихся охраны окружающей среды. В отношении биологического разнообразия принцип принятия мер предосторожности записан в преамбуле Конвенции о биологическом разнообразии, которая гласит: «Когда имеется угроза существенного уменьшения либо исчезновения биологического разнообразия, отсутствие полной научной определенности не должно являться причиной для непринятия мер к исключению или минимизации такой угрозы» [8]. Сегодня данный принцип содержат более 20 международных законов, договоров, протоколов и конвенций [7]. В Картахенском протоколе по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии [1] данный принцип вновь подтверждается в отношении проблемы безопасности ГИД: «Отсутствие научной достоверности ввиду недостаточности научной информации и знаний, касающихся масштабов возможного неблагоприятного воздействия живого измененного организма на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия в Стране импорта, с учетом также рисков для здоровья человека, не должно помешать этой Стране в принятии соответствующего решения относительно импорта живого измененного организма в целях предотвращения или максимального ограничения такого возможного неблагоприятного воздействия».

Приведенные формулировки принципа принятия мер предосторожности не требуют доказательства абсолютной безопасности технологии, но скорее предполагают ее ограничение в случае, если уровень научной неопределенности относительно потенциального риска является значительным, а возможности управления риском — недостаточными. При наличии обоснованных научных предположений о том, что новый процесс или продукт мо-

жет быть опасным, он не должен внедряться до тех пор, пока не будут получены доказательства того, что риск невелик, управляем и преимущества технологии его «перевешивают». В промежуток времени до внедрения технологии должны осуществляться исследования по улучшению оценки риска. Такое понимание принципа предосторожности, по-видимому, является наиболее взвешенным в отношении ГИД и способствует устойчивому мировому экономическому развитию.

Очевидно, что решение о том, является ли определенный риск ГИД приемлемым или неприемлемым в конкретных условиях, не является задачей процедуры оценки риска. Оценка риска должна объективно показать уровень научной неопределенности в прогнозе безопасности предлагаемой ГИД или продукта ГИД. Применение принципа предосторожности в этом смысле должно продемонстрировать, не абсолютным образом, но выше уровня обоснованных сомнений, что предлагаемая заявителем ГИД является безопасной. С целью прояснить порядок применения данного принципа в рамках Евросоюза Комиссия ЕС выработала определенные правила для использования принципа принятия мер предосторожности в процедурах оценки и управления риском ГИД политически прозрачным образом.

Данные требования определяют следующее:

- *Адекватность.* Меры по управлению риском ГИД не должны быть диспропорциональны желаемому уровню защиты и не должны иметь целью снизить риск до нуля.

- *Отсутствие дискриминации.* Сходные ситуации при оценке и управлении риском ГИД не должны рассматриваться различным образом и различные ситуации не должны рассматриваться сходным образом без объективных оснований делать таким образом.

- *Пропорциональность соответствия.* Меры по управлению риском ГИД в условиях недостаточности научных дан-

ных не должны быть сравнимы по природе и масштабу с мерами, уже принимавшимися в подобных случаях, когда все необходимые научные данные могли быть получены.

- *Изучение выгоды и стоимости действия или отсутствия действия.* Такое изучение должно включать экономический анализ (расчет соотношения цены и выгоды), когда он возможен и выполним.

- *Изучение научного развития.* Меры по управлению риском должны носить предварительный (временный) характер в ожидании возможности получить более существенные научные данные. Научные исследования должны продолжаться до получения более полных данных [9].

3. Понятие «научная неопределенность» в приложении к оценке риска генно-инженерной деятельности

Как отмечалось выше, принцип принятия мер предосторожности в контексте проблемы биобезопасности проистекает от скептицизма относительно возможностей современной науки или любых систем знаний для полного понимания и предсказания особенностей функционирования сложных биологических и экологических систем. Он констатирует, что велика вероятность ошибки в оценке риска ГИД и она тем более вероятна, чем больше степень научной неопределенности в понимании оцениваемых процессов и объектов.

Неопределенность является присущим и неизбежным аспектом науки в приложении к оценке риска ГИД и проявляется на всех уровнях оценки риска [6, 10]. К. Науес [10] приводит в своем докладе несколько возможных источников неопределенности на различных уровнях оценки безопасности генетически модифицированного организма. Например, на уровне внедрения целевого гена в геном реципиента может быть нарушена структура генов или регуляторных последовательностей генов реципиента с не всегда предсказуемым результатом их последующей транскрипции. Не все изменения транскрипции гена обязательно трансформиру-

ются в виде предсказуемых изменений в структуре синтезируемого белка. Характер фенотипического (экологического) проявления ГИО не является исключительно генотип-специфическим, но в большей степени зависит от среды высвобождения ГИО и поэтому может непредсказуемо варьировать. На уровне экосистемы в целом источником неопределенности является возникновение новых или изменение существовавших связей между объектами и процессами экосистемы в результате внедрения в нее ГИО. Как наиболее сложные для анализа, представляющие значительный уровень неопределенности, выступают именно экологические риски масштабного высвобождения ГИО.

В общем случае источником научной неопределенности среди прочих могут быть: несовершенство и ошибочность научных моделей, которые используются для предсказания событий и взаимодействий в сложных системах; недостаточность и противоречивость получаемых научных данных и присутствие неизбежных научных допущений [6]. В идеале результатом оценки риска должен быть минимум неопределенности относительно возможного ущерба ГИО для здоровья человека и окружающей среды. Сам факт выявления значимых пробелов в научных знаниях относительно природы ГИО и предполагаемых последствий его использования стимулирует интенсивный поиск более совершенных подходов, методов оценки риска. Чем более значительным представляется риск ГИД, тем меньший уровень неопределенности может быть приемлемым и тем более строгие доказательства требуются для его исключения.

Рациональное применение принципа принятия мер предосторожности в оценке риска ГИД с учетом неизбежности того или иного уровня научной неопределенности представляется следующим.

- Оцениваемые риски ГИД должны быть научно обоснованными.
- Научно необоснованные риски не должны препятствовать внедрению новых

технологий и продуктов, представляющих неоспоримые преимущества для общества.

- Пропорционально природе того или иного фактора риска и масштабу потенциального ущерба в процессе оценки риска должны прилагаться соответствующие усилия для уменьшения уровня неопределенности и научного доказательства его несущественности.

- Если риски обоснованны, то новые технологии не могут осуществляться или могут осуществляться с «избыточным» уровнем управления риском, пока не будет доказано, что риски невелики, а преимущества, напротив, значительны. Ошибка в избыточности мер управления риском в данном случае должна быть более приемлемой, чем ошибка недооценки риска.

- Неприемлемый уровень неопределенности в оценке того или иного риска должен стимулировать интенсивный поиск новых научных подходов, снижающий этот уровень до приемлемых масштабов.

4. Принципы оценки риска генно-инженерной деятельности

Научная информация, необходимая для ответов на поставленные в процессе оценки риска ГИД вопросы, анализируется в соответствии с рядом принципов (концепций). Они закреплены в различных международных правовых документах и проверены практикой. Базовыми концепциями оценки риска ГИД являются концепции *осведомленности* (familiarity) и *существенной эквивалентности*. При этом концепцию осведомленности можно рассматривать как экологический аналог (дополнение) концепции существенной эквивалентности. Данные подходы к оценке риска предусматривают, что любой (не-трансгенный) организм, традиционные продукты или технологии не являются сами по себе абсолютно безопасными. Поэтому оценки риска генно-инженерной деятельности должны осуществляться в сравнении с соответствующей традиционной деятельностью.

Сравнительный подход к анализу информации способствует адекватной оценке

риска ГИД и уменьшению масштабов неопределенности. В рамках процедуры оценки риска в сравнительном контексте рассматривается информация о ГИО, организме-реципиенте (хозяине), доноре, использованном для переноса трансгена молекулярном векторе. Выводы о степени безопасности ГИО производятся на основании уже имеющегося и обобщенного опыта использования ГИО (в лабораторных экспериментах, при мелкомасштабных испытаниях в окружающей среде, при крупномасштабном высвобождении). Начиная с середины 80-х годов накоплен значительный багаж знаний относительно использования человеком «новых» пищевых продуктов, ГИО и характера взаимодействия ГИО со средой высвобождения (данные лабораторных и полевых испытаний). Принимая решение о выдаче разрешения на ГИД, можно, таким образом, опираться на уже существующий опыт. При этом подразумевается, что поведение определенных типов ГИО будет предсказуемым и не потребует избыточных усилий в отношении управления рисками.

Упомянутые концепции оценки риска предусматривают обязательный сравнительный анализ факторов риска (потенциала опасности), присущих ГИО (продуктам, включающим ГИО и состоящим из ГИО) и их традиционным аналогам, для здоровья человека и окружающей среды [11-15]. Такой сравнительный анализ является стартовой точкой для процедуры оценки риска ГИД. Он определяет исходный, присущий аналогу уровень риска, относительно которого в дальнейшем оцениваются эффекты генетической модификации [2, 6, 16].

В рамках концепции осведомленности биологические особенности генно-инженерных организмов, признаки, определяемые трансгенами, технология коммерческого производства ГИО, особенности среды высвобождения и порядок использования ГИО анализируются в сравнении с традиционными аналогами. Цель сравнения — обоснование того, является

ли фенотип ГИО или процесс коммерческого производства ГИО новым для исследуемых экосистем. Это позволяет в дальнейшем сосредоточить внимание на оценке выявленных, не характерных для аналога экологических факторов риска и установить определенный уровень безопасности при использовании ГИО. Чем уже формулируется концепция осведомленности, тем она представляется более эффективной для оценки экологических рисков [2].

Концепция существенной эквивалентности, разработанная OECD и дополненная FAO/WHO [12, 15] чаще всего используется при оценке безопасности ГМ-пищевое сырье и продуктов питания. Согласно определению OECD, концепция существенной эквивалентности предусматривает, что традиционные продукты или пищевое сырье могут служить базой для сравнения при оценке безопасности или питательной ценности новых продуктов (в том числе, ГМ-продуктов). Данный сравнительный подход предусматривает, что: 1) традиционные продукты не являются абсолютно безопасными; 2) в случае, если новые продукты питания или их компоненты эквивалентны по существенным характеристикам традиционным продуктам или пищевым компонентам, их можно использовать таким же образом, не ожидая вредных дополнительных эффектов для здоровья человека.

Следовательно, безопасность нового продукта должна рассматриваться не вообще, а по отношению к традиционному аналогу. Определение «традиционный аналог» в приложении к ГИО или новым продуктам означает близкородственный организм, его компонент или сходные продукты, для которых имеется значительный опыт безопасного употребления в качестве пищи. Главная цель оценки риска, построенной на концепции существенной эквивалентности, – скорее не попытка идентифицировать любой источник опасности, ассоциированный с продуктами питания, но идентифицировать новые или изменен-

ные «старые» опасности по сравнению с традиционным аналогом. Оценка сфокусирована, во-первых, на идентификации сходства и различия между новой пищей (сырьем) и традиционным аналогом; во-вторых, на оценке безопасности идентифицированных различий.

Существенная эквивалентность ГИО и аналога устанавливается путем демонстрации того, что значимые для оценки пищевой безопасности характеристики ГИО и новых продуктов сходны с таковыми у традиционных аналогов [16]. При этом эквивалентность устанавливается по фенотипическим (морфологическим) признакам, по химическому составу ключевых соединений, характеру метаболизма, составу метаболитов и по питательной ценности [16,17].

Таким образом, анализ существенной эквивалентности предполагает, прежде всего, композиционный анализ ГИО (нового продукта) и его аналогов. При этом исследуются ключевые компоненты сравниваемых организмов (продуктов), которые наиболее важны для здоровья человека: питательные вещества и их антагонисты; токсичные вещества, аллергены и др. [15]. Среди питательных ключевых веществ выделяют главные (жиры, белки, углеводы) и минорные (минералы, витамины); к антагонистам питательных веществ относятся в основном ингибиторы определенных ферментов. Под ключевыми токсинами подразумевают известные природные соединения и вещества, присутствующие в оцениваемом сырье или продуктах, обладающие существенной для здоровья человека токсической потенциальностью (например, соланин в картофеле).

Характер композиционного анализа при оценке пищевой безопасности (его масштабы, приемлемая точность) является предметом обсуждения, и единых критериев пока не выработано. Организация по экономическому сотрудничеству и развитию (OECD) в рамках своей деятельности разработала специальные Согласительные документы (Consensus Documents) по от-

ношению к организмам, наиболее часто используемым для генетической модификации, где регламентированы обязательные для анализа существенной эквивалентности группы соединений [18]. Дополнительные исследования проводятся при необходимости, в зависимости от каждого рассматриваемого случая ГИД. При любых обстоятельствах композиционный анализ предполагает сотни отдельных биохимических исследований и является весьма дорогостоящим.

В предусмотренной процедуре определения существенной эквивалентности могут быть три варианта результатов: 1) ГИО (новый продукт) эквивалентен традиционному аналогу по существенным признакам; 2) ГИО (новый продукт) эквивалентен традиционному аналогу по существенным признакам, за исключением целевых (привнесенных) признаков модификации; 3) ГИО (новый продукт) неэквивалентен традиционному аналогу по существенным признакам. В первом случае (например, крахмал, полученный из генетически модифицированного картофеля) дальнейших тестов для определения безопасности не требуется (крахмал идентичен тому, который употреблялся многие годы ранее и не вызывал неблагоприятных эффектов). Во втором случае существенная эквивалентность установлена по важнейшим признакам, за исключением тех, которые определяются трансгенами. Поэтому дальнейшие исследования должны быть сфокусированы на безопасности проявления именно этих признаков (например, на безопасности эндогенного Вt-протеина в генно-инженерных растениях кукурузы, картофеля, томатов). При этом молекулярные продукты трансгенов подвергаются интенсивному исследованию с точки зрения их вероятной токсичности, аллергенности. Анализируются вероятные непредвиденные эффекты вставки гена, изменения метаболических путей и содержания метаболитов. В случае не эквивалентности сравниваемых организмов (продуктов питания) проводятся наиболее пол-

ные исследования безопасности отличительных признаков ГИО (новых продуктов питания). Объем и характер исследований зависят тогда от каждого конкретного случая оценки риска и диктуются выявленными особенностями исследуемого генно-инженерного организма или продукта питания, а также характером ГИД [16, 17].

Кроме приведенных выше базовых концепций процедуры оценки риска, ее методология основана также на следующих принципах [1,19].

- Оценка риска должна проводиться на научной основе, ясным, адекватным способом, базирующемся на подходящих предмету рассмотрения научных и технических данных.

- Оценку риска необходимо проводить на основе индивидуального подхода (*case by case*), последовательно, шаг за шагом (*step by step*), подразумевая, что требуемая информация варьирует в зависимости от типа рассматриваемого ГИО, способа его предполагаемого использования и потенциальной среды высвобождения.

- Риски, связанные с ГИО или содержащими их продуктами, должны рассматриваться в контексте рисков, существующих при использовании интактных (немодифицированных) реципиентных организмов в потенциальной принимающей среде.

В случае поступления новой информация о ГИО и его эффектах на здоровье человека и окружающую среду результаты оценки риска могут быть пересмотрены, чтобы определить, изменилась ли степень риска и есть ли необходимость в изменении системы управления риском.

В применении к практике оценки риска ГИД данные принципы определяют следующее. При ответе на оценочные вопросы информация о потенциальном риске ГИО анализируется в контексте рисков, которые уже существуют как следствие использования в практической деятельности людей традиционных организмов и технологий. Например, риск выращивания трансгенных растений, вырабатывающих

токсичный для насекомых-вредителей Вt-протеин, должен рассматриваться в контексте рисков традиционных технологий защиты растений (насколько он более значительный или качественно иной). Необходимую для оценки риска информацию следует анализировать на основании индивидуального подхода к каждому конкретному случаю генно-инженерной деятельности.

Потенциальная опасность отдельных факторов риска варьирует в зависимости от биологических особенностей оцениваемого ГИО, рассматриваемого трансгена, предполагаемого порядка использования ГИО и предполагаемой среды осуществления ГИД. Например, процесс высвобождения генетически модифицированного масличного рапса повышает вероятность переноса трансгенов к его диким сородичам на территории Европы (фактор риска), поскольку доказана его спонтанная гибридизация с рядом диких родственных видов [20]. В то же время перенос трансгенов от генно-инженерного картофеля на европейской территории маловероятен в связи с отсутствием диких родственных видов. Последствия переноса трансгенов в свою очередь зависят от того, какие именно признаки данный ген определяет. Так, с точки зрения приобретения экологических преимуществ растениями природных популяций (фактор риска) последствия вертикального переноса трансгенов устойчивости к насекомым-вредителям диким сородичам генно-инженерных растений будут более значимыми, чем таковые в случае генов устойчивости к гербицидам [21, 22].

Информация и данные, на основе которых проводится оценка риска, должны быть строго научными, а методы получения данных — адекватными поставленным задачам анализа.

В принципе, при оценке риска ГИД для получения и анализа данных должны применяться методы, максимально снижающие уровень научной неопределенности. Они, естественно, совершенствуются с течением времени и все более соответст-

вуют решению поставленных задач. Например, целевой композиционный анализ, использовавшийся до настоящего времени для определения существенной эквивалентности, позволял определять качественный и количественный состав ключевых химических компонентов ГИО (продуктов питания) и аналогов. Предмет анализа ограничивался важными для здоровья человека веществами (главными и минорными питательными веществами, известными антагонистами питательных веществ, известными токсинами). Недавно предложен нецелевой, профильный подход к композиционному анализу, позволяющий оценивать экспрессию генома в целом на уровне ДНК, мРНК, белков, метаболитов и обнаруживать с гораздо большей степенью надежности проявление так называемых побочных, непредусмотренных эффектов генетической модификации [16, 17].

5. *Методология оценки риска генно-инженерной деятельности*

Принципы, критерии и стандарты оценки риска ГИД, установленные международными организациями (FAO, WHO, WTO и др.) и прописанные в Картахенском протоколе по биобезопасности, прямо или косвенно влияют на разработку соответствующей процедуры в отдельных странах. Поэтому, несмотря на различие подходов к организации оценки риска ГИД в разных странах, ее сущность (методология) похожа в своих главных чертах.

В Картахенском протоколе по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии [1] рекомендована следующая методика проведения оценки риска ГИД (этапы оценки риска):

1. Выявление любых новых генотипных и фенотипных характеристик, связанных с живым измененным организмом, который может оказать неблагоприятное воздействие на биологическое разнообразие в вероятной потенциальной принимающей среде, с учетом также рисков для здоровья человека;

2. Оценка степени вероятности фактического возникновения таких неблаго-

приятных последствий, с учетом интенсивности и характера воздействия живого измененного организма на вероятную потенциальную принимающую среду;

3. Оценка последствий в том случае, если такое неблагоприятное воздействие действительно будет иметь место;

4. Оценка совокупного риска, вызываемого живым измененным организмом, на основе оценки вероятности возникновения и последствий выявленного неблагоприятного воздействия;

5. Вынесение рекомендации относительно того, являются ли риски приемлемыми или регулируемы, включая, если это необходимо, определение стратегий для регулирования таких рисков.

Оценка риска ГИД начинается с идентификации факторов риска. Идентификация факторов риска заключается (в простом приближении) в анализе того, является ли ГИО сам по себе вредоносным или патогенным для человека и окружающей среды; способен ли он содействовать появлению новых вредителей либо патогенных организмов в среде высвобождения или увеличить вредный эффект уже имеющихся.

Потенциальная опасность, присущая тому или иному организму, основана, прежде всего, на его биологии (возбудитель полиомиелита очевидно весьма опасен для здоровья человека, пекарские дрожжи в обычном применении — нет). Соответственно потенциальная опасность ГИД основана на природе ГИО и его взаимодействии с окружающей средой. При этом она может быть обусловлена биологическими особенностями исходных для генетической модификации организмов (реципиентов, доноров); экспрессией продуктов, определяемых встроенными генами; непреднамеренным изменением исходного уровня патогенности, токсичности, аллергенности организмов-хозяев в результате их генетической модификации; возможностью последующего переноса трансгенов другим организмам и т.д. Из этого следует, что идентификация факторов риска производится на основании тщательного изучения всей возможной научной информации,

касающейся исходных организмов, способа создания ГИО и биологии самого ГИО, а также среды осуществления ГИД. Такая полная информация собирается и представляется заявителем ГИД в компетентные органы, ответственные за выдачу разрешений на осуществление ГИД (содержание необходимой информации обычно определено в соответствующих нормативных правовых актах).

Многие потенциальные источники опасности ГИО могут быть предсказаны заранее, до проведения аналитических исследований. Например, на основании ранее полученных научных данных обычно известно, является ли бактерия-хозяин для производства генно-инженерного микроорганизма патогенной; продуцируют ли исходные для трансформации организмы токсические, вызывающие аллергию вещества. Тогда каждый присущий исходным организмам фактор риска должен быть рассмотрен в последующей процедуре оценки риска в ракурсе его возможных изменений, связанных с генетической модификацией. Точно также известная заранее информация об источниках трансгенов, о природе молекулярных продуктов трансгенов прямо указывает на возможные факторы риска (например, высокий аллергенный потенциал организма — донора трансгенов указывает на то, что и продукты трансгена в ГИО могут вызывать аллергическую реакцию у чувствительных к ним людей).

Из числа возможных подходов к идентификации факторов риска на практике применяются далеко не все. Простейший подход «жди и увидишь» используется редко. В условиях недостаточности научных знаний он может применяться только в рамках ГИД в замкнутых системах или в мелкомасштабных, контролируемых экспериментах по высвобождению ГИО (т.е. при «жестком» подходе к управлению риском ГИД). Чаще других, для идентификации факторов риска ГИО используется неструктурированный (дедуктивный) подход, заключающийся в составлении контрольных таблиц. В таблицу в результате «мозгового штурма» заносятся все возможные,

потенциально опасные особенности ГИО и признаки, способствующие их проявлению.

Идентификация факторов риска — основание всей процедуры оценки риска. Чем более точно поставлены вопросы о потенциальной опасности ГИД (чем более точно определены факторы риска), тем более достоверны (и убедительны для компетентных проверяющих органов и общественности) результаты оценки риска. Оценка риска должна быть сфокусирована на постановке вопросов о возможном риске ГИД, опирающихся на научные данные. Следует избегать оценки умозрительных факторов риска, которые не подлежат научной экспериментальной оценке. Это означает, что риск скорее должен быть чем-то проверяемым опытным путем, а не чем-то, опирающимся на необоснованные логические возможности [2]. Например, риск возможного превращения культурного растения в сорняк в результате генетической модификации является фактором риска, который можно оценить измерением ряда признаков генно-инженерного растения в сравнении с признаками известных сорных растений (периода покоя семян, всхожести семян, уровня распространения семян, сроков созревания, конкурентоспособности и др.).

Все факторы риска ГИД обычно классифицируют на те, что несут потенциальную угрозу здоровью человека и сельскохозяйственным животным, и те, которые несут угрозу окружающей среде. Далее факторы риска разделяют по отношению к конкретному виду ГИД: факторы риска ГИД в замкнутых системах либо факторы риска ГИД, связанной с высвобождением ГИО в окружающую среду. Факторы риска классифицируют также в зависимости от природы самих ГИО: обусловленные неблагоприятным воздействием генно-инженерных микроорганизмов, генно-инженерных высших растений либо животных. Кроме того, факторы риска подразделяют в зависимости от порядка взаимодействия ГИО с компонентами окружающей среды в ус-

ловиях предлагаемой ГИД. Они могут воздействовать на здоровье человека и окружающую среду прямо и опосредованно, через механизмы, включающие: распространение ГИО в окружающей среде; перенос трансгенов от ГИО другим организмам; фенотипическую и генетическую нестабильность; взаимодействие ГИО с другими организмами; изменение порядка хозяйственной деятельности [19].

Объективные трудности определения количественных параметров риска, разумеется, не указывают на то, что для оценки риска ГИД не применяются количественные методы анализа. Напротив, процедура оценки риска каждой конкретной ГИД включает в себя множество (сотни) экспериментальных количественных оценок. При этом, однако, измерению чаще подвергаются лишь отдельные показатели ГИО или среды осуществления ГИД, касающиеся оцениваемого риска. Данные показатели (например, концентрация гликоалкалоидов в съедобных частях генно-инженерных растений, индекс токсичности LD₅₀ в экспериментах по принудительному скармливанию оцениваемого агента, время деградации белка в желудочно-кишечном тракте, расстояние переноса пыльцы генно-инженерного растения ветром и пр.) являются необходимыми для вынесения итогового заключения (на них строится доказательная база уровня риска). При этом только отдельные из них могут с определенной степенью точности дать количественную оценку вероятности осуществления неблагоприятного воздействия. Например, в модельных экспериментах частота трансформации бактерий микрофлоры кишечника плазмидой широкого круга хозяев pGKV21 (которая оказалась ниже порогового уровня детекции 10⁻⁹) может быть использована (с некоторыми допущениями) для количественной оценки вероятности горизонтального переноса трансгенов устойчивости к антибиотикам (один из факторов риска ГИД) [23]. Определенные в тестах *in vitro* показатели связывания иммуног-

лобулинов сыворотки крови чувствительных к пищевой аллергии людей с белковыми аллергенами могут количественно характеризовать аллергенный потенциал ГИО и (в совокупности с данными о вкладе ГИО в пищевой рацион) риск его аллергенности.

Наибольшие затруднения вызывает оценка риска ГИД, если оцениваемый риск обусловлен множественными процессами в их взаимодействии (комплексные риски, которые составляют основную часть из числа оцениваемых). При этом даже с учетом измерения отдельных характеристик ГИО, существенных для оцениваемого воздействия, рассчитать его вероятность и величину последствий практически невозможно (тем более при высоком уровне научной неопределенности). В таком случае на основании измеренных в эксперименте (или уже известных) количественных характеристик существенных признаков или процессов формулируется качественная по форме оценка риска. Для примера приведем один из подходов (концепция ботанических файлов) к оценке риска комплексного экологического фактора риска — переноса трансгенов от генно-инженерных высших культурных растений к их диким сородичам в среде высвобождения. Ботанический файл включает количественные данные измерения многих признаков, определяющих возможность вертикального переноса трансгенов. Признаки, включенные в файл, характеризуют оцениваемый вид генетически модифицированных растений в регионе высвобождения. На основании количественных данных рассчитываются индексы вероятности для следующих показателей: 1) распространение пыльцы; 2) распространение репродуктивных частей растений — семян, плодов; 3) масштаб распространения диких родственных видов растений. Каждый индекс подразделяется на 7 уровней потенциального риска, что дает количественное выражение качественным по сути оценкам: 0 - нет вероятности воздействия; 1—5 - градации от низкой до высо-

кой вероятности воздействия; N - неизвестная вероятность воздействия, означающая, что необходимы дальнейшие исследования. Три указанных индекса объединяются и формируют интегральную оценку, которая, собственно, и определяет вероятность и масштаб вертикального переноса трансгенов. Если хоть один из индексов равен 0, риск комплексного фактора оценивается как низкий или практически равный нулю [2]. Сложность количественной оценки и большой уровень научной неопределенности при рассмотрении рисков ГИД означает на практике, что оценка риска в большинстве случаев является скорее качественным, нежели количественным анализом [4].

Тем не менее, качественные оценки риска получают, принимая во внимание комбинацию оценок вероятности неблагоприятного воздействия идентифицированных факторов риска ГИД и масштаба соответствующих последствий. На качественном уровне оценка вероятности воздействия идентифицированных факторов риска может иметь следующую градацию: «высокая», «средняя», «низкая» и «незначительная».

Сходным образом последствия неблагоприятных воздействий оценивают как «тяжелые», «средней тяжести», «малой тяжести» и «незначительные». Оценки риска в такой интерпретации могут оказаться следующими: «высокий», «средний», «низкий» и «практически равный нулю». При оценке риска обязательно учитывается комбинация вышеуказанных качественных оценок. Например, если оценка потенциальных последствий воздействия определена как «незначительная», то, даже несмотря на возможную высокую вероятность осуществления данного воздействия, риск будет оценен как «низкий». Результаты проведения оценки риска могут быть выражены в следующей таблице:

Оценки риска генно-инженерной деятельности (риск = масштаб последствий × вероятность неблагоприятного воздействия)

| Последствия неблагоприятного воздействия | Вероятность неблагоприятного воздействия факторов риска | | | |
|--|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | высокая | средняя | низкая | незначительная |
| Тяжелые | Высокий риск | Высокий риск | Средний риск | Риск практически равен нулю |
| Средней тяжести | Высокий риск | Средний риск | Средний/малый риск | Риск практически равен нулю |
| Малой тяжести | Средний/низкий риск | Низкий риск | Низкий риск | Риск практически равен нулю |
| Незначительные | Риск практически равен нулю | Риск практически равен нулю | Риск практически равен нулю | Риск практически равен нулю |

Исходя из общего подхода к оценке риска ГИД, после оценки отдельных идентифицированных факторов риска определяется кумулятивный эффект согласованного воздействия ГИО на флору и фауну, плодородие почвы, деградацию органических компонентов почвы, пищевые (кормовые) цепи, биологическое разнообразие, здоровье человека и животных, устойчивость живых организмов к антибиотикам и т.д. [19]. Оценка такого совокупного воздействия не может быть подчинена каким-либо жестким схемам или правилам, она является творческим процессом (*state of the art*) [10]. В итоге оценка риска должна не только вскрывать объективный уровень опасности каждого заявляемого вида ГИД, но и, что не менее важно, определять необходимые меры по управлению риском в период осуществления ГИД.

б. Информация, необходимая для оценки риска генно-инженерной деятельности

В рамках процедуры оценки риска вероятность неблагоприятных воздействий ГИО и масштаб неблагоприятных последствий ГИД (и собственно оценки риска ГИД) определяются путем ответа на множество специальных вопросов, касающихся идентифицированных факторов риска, природы ГИО, среды осуществления ГИД, взаимодействия ГИО со средой осуществления ГИД. Для ответа на эти вопросы заявитель должен получить, проанализировать и предоставить компетентным разрешительным органам соответствующую информацию, которая принципиально идентична

по содержанию при оценке риска в различных странах и регламентирована рядом международных документов (например, Директивой 2001/18/ЕС [19]). Организацией по экономическому сотрудничеству и развитию ООН (OECD) разработаны так называемые согласительные документы (*consensus documents*), в которых указано, какая именно информация необходима для оценки риска живых организмов, наиболее часто являющихся объектом генетической модификации [18].

В каждом конкретном случае при проведении оценки риска учитываются соответствующие научные данные, касающиеся ГИО, реципиентного и донорного организмов, потенциальной принимающей среды и их взаимодействия. Рассмотрим суть регламентированной информации с точки зрения ее существенности для процедуры оценки риска.

Прежде всего, анализируется информация о биологических особенностях организмов, которые были использованы для получения ГИО (организм-хозяин, реципиент, донор, родительский организм). Информация об исходных для проведения модификации организмах является базовой для сравнения с трансгенными организмами и определяет исходный уровень риска. Например, в случае осуществления ГИД в замкнутых системах весьма существенна информация, касающаяся патогенности исходных организмов, в первую очередь характера репродуктивных циклов исходных организмов; природы их неблагоприятного

воздействия на здоровье человека; уровня инфекционности; присутствия генов устойчивости к антибиотикам; возможного взаимодействия с другими организмами в окружающей среде; способности к формированию структур для выживания (спор, склероций) и ряда других сведений. На основании этой информации определяется необходимый уровень защиты в замкнутых системах, предотвращающий риск заболевания персонала и непредусмотренного высвобождения ГИО.

В случае оценки ГИД, связанной с высвобождением ГИО в окружающую среду, для оценки исходного уровня риска и установления факторов риска ГИО необходимы сведения, касающиеся особенностей размножения и распространения исходных организмов, характеристики их выживания в природной среде, данные о различных формах их токсичности и аллергенности для людей и животных. К примеру, особенности биологии размножения растений-реципиентов определяют стартовую точку для оценки вероятности переноса трансгенов от ГИО другим организмам. Если исходные организмы несут гены, определяющие синтез токсичных, аллергенных компонентов, этот факт при оценке риска ГИД вызовет вопрос о возможности непреднамеренного изменения уровня продукции данных компонентов у ГИО.

Далее, для оценки риска ГИД весьма подробно рассматривается информация о природе самой генетической модификации, включающая среди прочего: метод получения трансгенного организма; особенности и источник вектора; точное описание встроенного в геном реципиента фрагмента ДНК; определение сайтов встраивания и стабильности инкорпорации вставки, а также ряд других сведений. Такого рода информация позволяет проследить, какие именно ге-

ны перенесены исходному организму (есть ли среди них те, которые обуславливают повышенный риск, например маркерные гены устойчивости к антибиотикам, гены, определяющие синтез антинутриентов, и пр.). Она также позволяет снизить уровень научной неопределенности, касающейся возможных непреднамеренных эффектов модификации. Так, данные о сайтах встраивания, стабильности трансгенов используют для оценки вероятности возможного изменения активности генов организма-реципиента, плейотропных эффектов модификации. Информация о регуляторных элементах переносимой молекулярной конструкции позволяет судить об ожидаемом уровне экспрессии целевого гена и ее тканеспецифичности.

Следующий блок необходимой для оценки риска информации включает сведения о биологических особенностях самого модифицированного организма. Сюда относится подробное описание генотипа и фенотипа ГИО с акцентом на признаках и характеристиках, которые появились либо утратились по сравнению с исходным организмом. Кроме того, рассматриваются данные о генетической стабильности и уровне экспрессии всех трансгенов (включая маркерных) в геноме ГИО, синтезе кодируемых трансгенами продуктов и тканеспецифичности этого синтеза. Такого рода информация позволяет с определенной степенью надежности сравнивать риск от использования ГИО с уже существующими рисками от использования «традиционных организмов» (аналогов). Например, исходя из уровня продукции кодируемых трансгенами токсинов, антипитательных веществ, аллергенов в съедобных и несъедобных частях генно-инженерного растения, можно обнаружить изменения потенциала токсичности, аллергенности ГИО по сравнению с исходными аналогами. При оценке экологического риска переноса трансгенов растениям популяций диких сородичей ГИО весьма суще-

ственна, как уже отмечалось выше, информация о способности модифицированных растений к скрещиванию (фертильность, стерильность, совместимость). Характеристики кодируемых трангенами белков (биологическая активность; скорость распада в почве после отмирания растений; скорость деградации в желудочно-кишечном тракте; сходство последовательности аминокислот с известными токсичными белками и др.) позволяют оценить их потенциальную опасность для здоровья человека, а также для иных, нецелевых (не являющихся «мишенью» трансгенных признаков) наземных и почвенных организмов.

Наконец, для оценки риска существовавшая информация о среде проведения ГИД и о взаимодействии ГИО с принимающей окружающей средой. Так, информация о степени «замкнутости» системы осуществления ГИД, масштабах высвобождения ГИО определяет возможность управления риском ГИД и, как результат, уровень приемлемости выявленных рисков. Сведения о характере контроля ГИД в замкнутых системах позволяют судить о вероятности непредусмотренного высвобождения ГИО (или пыльцы, семян, плодов ГИО) и тем самым оценить истинную возможность неблагоприятного воздействия ГИО на окружающую среду. Для оценки экологических рисков, возникающих при высвобождении генно-инженерных высших растений (таких, как уменьшение биоразнообразия, угроза появления новых сорных растений и др.), очень важны, к примеру, сведения о биологических особенностях ГИО, которые могут повысить его выживаемость, конкурентоспособность в среде высвобождения. Наличие либо отсутствие в регионе высвобождения диких сородичей ГИО также существенно влияет на оценку риска. Наиболее значим риск вертикального переноса трансгенов в регионах — центрах происхождения культурных растений, где наблюдается наибольшее

представительство и плотность произрастания диких сородичей ГИО. С точки зрения оценки рисков генно-инженерных микроорганизмов для окружающей среды важна информация о факторах среды, способствующих их размножению, распространению, о возможных организмах-носителях, о наличии в окружающей среде организмов, которые могут быть инфицированы и поражены и т.д. Данная информация наряду с иными сведениями позволяет принять решение, например, о возможности использования генно-инженерных микроорганизмов в производстве продуктов питания, лекарственных препаратов и мерах защиты персонала.

Информация о порядке взаимодействия ГИО с компонентами среды: уровне токсичности продуктов трансгена для других организмов; участии ГИО в пищевых цепях — позволяет судить об угрозе ГИД для нецелевых организмов, о возможности резкого изменения динамики численности природных популяций. Так, сведения о насекомых, подверженных действию трансгенного Вt-протеина, дают возможность рассматривать угрозу уничтожения полезных насекомых наряду с вредителями при культивировании устойчивых модифицированных растений. Информация о действии трансгенного гормона роста и цепях питания морских организмов позволяет оценить возможность неконтролируемого увеличения численности трансгенных рыб за счет быстрого роста их малька и снижения масштабов его «поедания» другими рыбами. Данные о порядке взаимодействия трансгенных растений и инфицирующих их вирусов помогают оценить риск так называемой транскансидации.

Информация, необходимая для оценки риска ГИД, носит строго научный характер и собирается из различных источников. Основным источником — результаты экспериментальных (исследовательских) работ, проведенных специ-

ально в процессе оценки риска ГИД, или известные заранее. К примеру, оценка риска высвобождения генетически модифицированных растений может потребовать более 1000 разнообразных экспериментальных проверок, учета знаний о представителях флоры и фауны региона высвобождения, о принятых в конкретной стране приемах земледелия и основах землепользования, характерных климатических условиях и т.д. [24]. Кроме данных непосредственного анализа ГИО и его взаимодействия со средой осуществления ГИД, источником информации являются данные моделирования ГИД (математического, компьютерного и т.д.). Анализ результатов модельных экспериментов важен для оценки экологических рисков масштабного высвобождения ГИО, когда речь идет об оценке отдаленных во времени последствий воздействия ГИО. Оценка риска базируется, конечно, и на теоретических научных знаниях и, прежде всего, на теоретических основах наследственности и изменчивости организмов (законах Менделя, законе гомологических рядов Вавилова, законах популяционной генетики и пр.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка технологий получения генно-инженерных организмов, внедрение ГИО в нашу повседневную жизнь в виде, прежде всего, новых более эффективных сортов сельскохозяйственных растений, новых лекарств, методов лечения болезней, инициировали появление фактически новой науки – биобезопасности, призванной обеспечить получение максимальной выгоды от использования ГИО при их обязательной безопасности для здоровья человека и окружающей среды. За сравнительно короткий срок были сформулированы базовые концепции, принципы биобезопасности, разработаны и внедрены эффективные методы оценки риска генно-инженерной деятельности. Эти принципы и методы закреплены в ряде международных до-

кументов, актах законодательства многих стран, что делает их применение обязательным для любого нового ГИО, который предполагается использовать на благо человечества. Методы оценки риска ГИД постоянно совершенствуются, расширяются опыт и объем знаний в этой области. Благодаря широкому использованию принципа принятия мер предосторожности в виде государственного регулирования процессов создания, испытания и использования ГИО, разработке и применению научных подходов и методов оценки рисков, связанных с ГИО, удалось добиться того, что к настоящему моменту не зафиксировано ни одного документально подтвержденного случая неблагоприятных эффектов ГИО на здоровье человека и окружающую среду. Это делает весьма оптимистичным прогноз относительно дальнейшего расширения масштабов использования генно-инженерных биотехнологий.

Принятое в Республике Беларусь в 2006 году законодательство вобрало весь положительный опыт, имеющийся в практике биобезопасности. В частности, изложенные выше базовые принципы нашли отражение в Законе Республики Беларусь «О безопасности генно-инженерной деятельности» [25], Инструкции о порядке проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека [26], Инструкции о порядке проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на окружающую среду [27]. Законодательством установлен порядок осуществления государственной экспертизы безопасности ГИО, опопределены органы государственного управления, ответственные за ее проведение [28]. Специалистами Национального координационного центра биобезопасности подготовлена и опубликована монография «Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика» [29], в которой,

среди прочего, подробно изложены базовые принципы и методы оценки риска генно-инженерной деятельности, благодаря чему она может быть использована в качестве руководства экспертами, осуществляющими оценку риска ГИД в нашей стране, а также в других странах бывшего Советского Союза.

Список использованных источников

1. Картахенский протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии. Текст и приложения. Монреаль. 2000. 40 с.

2. Conner A. J., Glare T.R., Nap J.P. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment // *The Plant J.* 2003. Vol. 33. P. 19—46.

3. Peterson R.K.D. Risk as a science // *Agricultural and Biological Risk Assessment. Biotechnology Risk Assessment date: Facts and Conclusions.* USDA and University of Florida, 2002 (<http://www.riskassess.org/index.cfm>).

4. Kinderlerer J. Tools of Regulation. An Initiative of the United Nations Environment Program (UNEP) Guide to Risk Assessment and Biosafety in Biotechnology, GRABB, 1997.

5. Levin M. Ecological Issues Related to Release of Microorganisms. An Initiative of the United Nations Environment Program (UNEP) Guide to Risk Assessment and Biosafety in Biotechnology, GRABB, 1997.

6. The Royal Society of Canada. Elements of Precaution: Recommendations for the Regulation of Food Biotechnology in Canada. An Expert Panel Report on the Future of Food Biotechnology prepared by The Royal Society of Canada at the request of Health Canada Canadian Food Inspection Agency and Environment Canada, 2001. P. 1—242 (<http://www.rsc.ca>).

7. Barrett K.J. Canadian Agricultural Biotechnology: Risk Assessment and the Precautionary Principle. Ph.D. Thesis. Van-

couver: University of British Columbia, 1999.

8. Конвенция о биологическом разнообразии. Текст и приложения. Монреаль. 1992. 34 с.

9. Communication from the Commission on the Precautionary Principle. Commission of the European Communities, Brussels, 26 January 2000.

10. Hayes K. Environmental Risk Assessment for GMO's. CSIRO Biodiversity sector — GMO risk assessment initiative. 2002. P. 1—35. (<http://www.agbiotech.net>).

11. Field Testing Genetically Modified Organisms: Framework for Decision. US National Research Council. Washington DC, 1989: National Academy Press.

12. Safety Evaluation of Foods Derived of Modern Biotechnology: Concepts and Principles. OECD, Paris, 1993. P. 1—74.

13. Safety Considerations for Biotechnology: Scale-up of Crop Plants, OECD, Paris, 1993.

14. Biotechnology and food safety. Report of a Joint FAO/WHO Consultation, Rome, Italy, 30 September — 4 October 1996. FAO Food and Nutritional Paper 61. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1996 (<http://www.fao.org/es/esn/gm/biotech-e.htm>).

15. Report of the first session of the Codex ad hoc Intergovernmental Task Force

16. on Foods Derived from Biotechnology (ALINORM 01/34). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2000 (<http://www.fao.org/es/esn/gm/biotech-e.htm>).

17. Kuiper H. A. Safety evaluation of genetically modified foods and animal feed as a basis for market introduction // Report of the Demonstration Programme on Food Safety Evaluation of Genetically Modified Food as a Basis for Market Introduction / Ed. M. Horning. The Hague: Ministry of Economic Affairs, 1998. P. 7—19.

18. Kuiper H. A., Kleter G. A., Noteborn H. P. J. M., Kok E.J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods // *The Plant J.* 2001. Vol. 27, No. 6. P. 503—528.
19. Expert Group on The Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, Consensus documents, 1998-99.
20. OECD, Paris: 2001, Inter-Agency Network for Safety in Biotechnology (<http://www.oecd.org/ehs/cd.htm>).
21. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC // *Off. J. Eur. Commun.* 2001. L106. P. 1—23.
22. Eastham K., Sweet J. Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. A review and interpretation of published literature and recent/current research from the ESF 'Assessing the Impact of GM Plants'(AIGM) programme for the European Science Foundation and the European Environment Agency. Environmental issue report No. 28. EEA. Copenhagen, 2002. — 75 p.
23. Seidler R.J., Wartrud L.S., George S.E. Assessing risks to ecosystems and human health from genetically modified organisms // *Handbook of environmental risk assessment and management* / Ed. P. Calow Publisher: Blackwell Science Ltd. Oxford, UK, 1998. P.1 10—146.
24. Levidow L. Precautionary risk assessment of Bt maize: what uncertainties? // *J. Invertebrate Pathology.* 2003. Vol. 83 P.113—117 (<http://www.elsevier.com/locate/yjipa>).
25. Van der Vossen J.M.B.M., Havekes W.A.L.M., Koster D.S. et. al. Development and application of in vitro intestinal tract model for safety evaluation of genetically-modified foods // *Report of the Demonstration Programme on Food Safety Evaluation of Genetically Modified Food as a Basis for Market Introduction* / Ed. M. Horning. The Hague: Ministry of Economic Affairs. P. 81—96.
26. AgBios Date Base. GTS 40-3-2 Food Safety Assessment Case Study. <http://www.agbios.com/>.
27. Закон Республики Беларусь от 9 января 2006 г. «О безопасности генно-инженерной деятельности»// Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. 2006, № 2, 2/1193.
28. Инструкция о порядке проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека. Утверждена постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 25 августа 2006 г. №076-086.
29. Инструкция о порядке проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на окружающую среду. Утверждена постановлением Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь от 22 августа 2006 г. №55 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь, 2006, № 150, 8/15002.
30. Положение о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения. Утверждено постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 8 сентября 2006 г. № 1160 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь, 2006, № 151, 5/22922.
31. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика. /Под ред. А.П. Ермишина / А.П. Ермишин, В.Е. Подлиских, Е.В. Воронкова, Б.Ю. Анощенко, В.М. Зарьков. Мн.: Тэхналогія. 2005. — 430 с.

Дата поступления статьи 20 ноября 2007 г.

А.И. Ковалевич, В.Е. Падутов, А.И. Сидор, О.Ю. Баранов

**СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЦИОНАЛЬНОГО
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И СОХРАНЕНИЯ ЛЕСНЫХ РЕСУРСОВ (ОБЗОР)**ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71

Лесные древесные виды, в отличие от сельскохозяйственных культур, имеют длительный жизненный цикл и произрастают в природных ландшафтах, поэтому для успешной адаптации видов к изменениям условий окружающей среды необходимо максимально полное сохранение их генетических ресурсов. От величины генетической изменчивости, которой характеризуется популяция, зависит ее адаптивность и экологическая пластичность. Чем выше генетический потенциал, тем более сильное воздействие негативных факторов может выдержать популяция и тем более разнообразные места обитания она может заселять [1].

На состояние лесных генетических ресурсов негативное влияние оказывают различные факторы, однако, определяющее воздействие среди них имеют антропогенные. Вызванный антропогенным воздействием темп вымирания видов превышает все, что известно на этот счет из палеонтологической летописи, а современные способы эксплуатации лесов носят характер катастроф, нередко по интенсивности на порядок превышающих природные. В результате происходит деградация и вымирание популяций различных видов, особенно редких и находящихся под угрозой исчезновения, что неотвратимо изменяет генофонд. В совокупности антропогенные факторы могут вызывать изменения, которые не совпадают с характером и темпами природного исторического развития видов, с направлением естественного эволюционного процесса [2]. Каждый вид человеческой деятельности, каждый аспект ведения лесного хозяйства имеет экологический и генетический эффект и в на-

стоящее время крайне необходимо правильно оценивать эти эффекты и учитывать при проведении конкретных мероприятий, если мы хотим сохранить здоровые и устойчивые лесные экосистемы.

Основными факторами, оказывающими влияние на состояние лесных генетических ресурсов, являются уничтожение лесов, фрагментация лесных угодий, эксплуатация лесов, загрязнение окружающей среды, интродукция и, в последнее время, глобальные изменения состояния окружающей среды. Эти виды угроз перекрываются в большой степени и в каком-либо отдельном случае может сказываться их взаимодействующее влияние [2].

Для предотвращения негативных последствий вышеуказанных факторов и для рационального использования лесных генетических ресурсов в Институте леса НАН Беларуси (ранее Белорусский научно-исследовательский институт лесного хозяйства системы Госкомитета СССР по лесу) первые работы начали проводиться уже в конце 50-х годов, сначала под руководством Савченко А.И., а затем Орленко Е.Г. и Поджаровой З.С. Особое внимание было уделено выделению плюсовых деревьев и сравнению потомства от плюсовых и нормальных деревьев [3].

Для оценки отобранных фенотипов по потомству к настоящему времени было создано 71,3 га испытательных культур (испытывается 1339 плюсовых деревьев) и 23,9 га архивов клонов (представлено 502 клон). По результатам многолетних исследований полусибсовых потомств материнских деревьев в испытательных культурах выделено кандидатами в элиту 184 плюсовых дерева, 11 плюсовых насажде-

ний – кандидатами в сорта-популяции, отобрано около 40 клонов сосны с высокими показателями смолопродуктивности. В испытательных и географических культурах старше 15-летнего возраста проведена селекционная оценка деревьев и отобрано 439 плюсовых деревьев (вторичного отбора).

В 60-80х годах прошлого столетия лесосеменные плантации, созданные для получения партий семян для лесовосстановления, закладывались на основании морфологической оценки лучших деревьев в природных популяциях. В настоящее время лесосеменные плантации создаются из вегетативного потомства тех деревьев, которые имеют наилучшие показатели в потомстве при анализе испытательных культур. Только клоны таких деревьев используются для создания лесосеменных плантаций 2 порядка, т.е. лесосеменных плантаций с улучшенными наследственными свойствами [4].

На основании результатов проведенных исследований разработана долгосрочная программа развития селекционно-семеноводства лесобразующих видов Беларуси на период до 2015 года, которая реализуется в настоящее время. Согласно этой программе лесное селекционное семеноводство должно стать стратегическим курсом лесного хозяйства в лесовосстановлении и лесоразведении. Для решения новых задач по развитию лесного селекционного семеноводства выделены приоритетные направления: сохранение лесных генетических ресурсов, дальнейшее развитие и совершенствование лесосеменной базы, селекция лесных древесных видов. Мероприятия по сохранению генетического потенциала лесов проходят красной нитью через всю программу [5].

В области совершенствования лесосеменной базы на планируемый период намечено развитие двух направлений семеноводства: популяционного и плантационного с примерно равным вкладом каждого в общий объем заготовки семян, используемых для восстановления лесов. Такая схема развития лесного семеноводства полностью обеспечит потребности

предприятий лесного хозяйства в семенном материале с улучшенными наследственными свойствами для создания эксплуатационных лесов с обычным оборотом рубки, для закладки культур специального назначения, а также для защитного и рекреационного лесоразведения. Причем создание долговечных высокопродуктивных искусственных насаждений, устойчивых к неблагоприятным факторам среды будет проводиться на широкой генетической основе. Для выращивания целевых насаждений будут использоваться сорта со сравнительно узкой генетической базой.

В целях совершенствования повышения эффективности лесосеменной базы организован Республиканский лесной селекционно-семеноводческий центр и два его филиала. Благодаря этому в лесном хозяйстве внедряются современные технологии переработки и хранения лесных семян.

В результате исследований обоснованы основные схемы селекционных процессов, разработаны рекомендации по созданию семенных плантаций сосны обыкновенной, ели европейской, дуба черешчатого, селекции и семеноводству березы карельской, основные положения по выделению и сохранению лесных генетических ресурсов, лесосеменное районирование Беларуси. Для обоснования лесосеменного районирования на площади 83,4 га заложены географические культуры.

Необходимо отметить, что в настоящее время в республике создана экспериментальная база для селекции основных лесобразующих видов. Проведено изучение фенотипической структуры популяций основных лесобразующих пород (сосны обыкновенной, ели европейской, дуба черешчатого, березы карельской). В ходе селекционной инвентаризации лесов отобрано 1367,5 га плюсовых насаждений и 3434 плюсовых дерева. Заложено лесосеменных плантаций основных лесобразующих пород первого поколения 1072 га, второго поколения – 440,1 га [6].

На созданных лесосеменных плантациях хвойных в настоящее время заго-

тавливаются около 15 % семян от их общей потребности. Внедрение разработанных современных эффективных методов и технологий повышения урожайности плантаций обеспечивает прибавку урожая на 15-25 % с 1 га. Это позволит ежегодно обеспечить селекционным улучшенным посадочным материалом насаждения высокопродуктивных хвойных пород на площади 5,5-6 тыс. га.

На лесных экспериментальных базах Института леса апробируются и внедряются в лесохозяйственное производство республики интенсивные технологии ускоренного (40-50 лет) выращивания крупномерной древесины хвойных пород (пиловочник), имеющих высокий спрос на мировом рынке.

Дальнейшая реализация мероприятий по сохранению лесных генетических ресурсов будет проводиться в рамках национальной программы "Создание генетического фонда хозяйственно-полезных растений". Площадь генетических резерватов увеличится до 15,0 тыс. га, плюсовых насаждений - до 3,0 тыс. га. Дополнительно будет отобрано свыше 3,0 тыс. шт. плюсовых деревьев, создано около 200 га искусственных объектов. Конечная цель – формирование сети объектов по сохранению генетических ресурсов.

Поскольку сохранение потомства от отдельных элитных деревьев и плюсовых насаждений является сложной проблемой как из-за хозяйственной деятельности, так из-за изменения условий произрастания (глобальное потепление климата), при Институте леса НАН Беларуси, в рамках Государственной программы по сохранению генофонда видов и при поддержке Министерства природных ресурсов РБ, создан генетический банк семян лесных растений. Разработана программа и этапы формирования коллекционного фонда семян и начала ее реализация. С учетом генетического банка, а также Республиканского лесного селекционно-семеноводческого центра и его филиалов, сегодня свыше 80 % семенного фонда хвойных видов хранятся в регулируемых условиях температуры и влажности среды.

Для хранения и эффективного использования информации о лесных генетических ресурсах создана компьютерная база данных. Создание такой базы осуществляется в рамках мероприятий по использованию в селекционно - семеноводческих исследованиях современных компьютерных технологий. В результате этого разработаны новые методы выявления и фиксации фенотипических признаков лесных древесных растений, технологии получения биометрической информации с использованием компьютерного анализа изображений биологических объектов. В первую очередь эти данные используются для решения важнейшей задачи селекции растений – идентификации генотипов по их фенотипам.

Большое внимание уделяется также интродуцентам как в плане предотвращения засорения природных популяций чужеродным наследственным материалом, так и с целью максимального использования возможности повышения продуктивности и устойчивости создаваемых насаждений, сокращения оборота рубки, улучшения рекреационных функций лесов. Так с 2001 года ведется селекционная оценка имеющихся посадок интродуцентов и создание постоянной лесосеменной базы перспективных видов. Общая площадь семенных плантаций интродуцентов должна составить около 70,0 га. Следует отметить, еще раз отметить, что введение интродуцированных растений в культуру во всех случаях производится после тщательных предварительных их испытаний. При этом ограничивается использование интродуцированных видов, спонтанная гибридизация с которыми может ухудшить потомство местных популяций, генетических резерватов, сортоиспытательных участков, лесосеменных плантаций и других селекционно-генетических объектов вследствие заноса и фиксации нежелательных генов.

Необходимо отметить, что все эти мероприятия также могут оказать негативное влияние на состояние лесных генетических ресурсов. Во-первых, из-за того, что в присортовом семеноводстве используется ограниченное количество деревьев. Во-

вторых, из-за того, что процесс естественного формирования генетической структуры природных популяций может сильно отличаться от того, что происходит при искусственном лесоразведении и лесовосстановлении.

На предотвращение негативных последствий селекционного семеноводства и искусственного лесовосстановления, направлены работы по генетической оценке естественных и искусственных насаждений лесообразующих пород.

В институте разработаны технологии молекулярно-генетического анализа 32 лесообразующих хвойных и лиственных видов Беларуси и сопредельных государств, 15 видов лесных насекомых и 10 видов грибов, являющихся возбудителями заболеваний древесных пород.

Благодаря этому у данных видов проведен анализ генетической структуры, определен уровень генетической изменчивости, степени подразделенности и дифференциации среди природных популяций. Это позволило определить основные критерии выделения насаждений в качестве генетических резерватов, а также предложить варианты расчетов их минимальных размеров, исходя из данных об уровне естественного мутагенеза и присущего конкретным насаждениям уровня генетической изменчивости [2]. В настоящее время осуществляется оценка генетического потенциала генетических резерватов, лесосеменных плантаций, архивно-маточных плантаций и плюсовых деревьев сосны обыкновенной и ели европейской, используемых в селекционно-семеноводческом процессе лесного хозяйства Беларуси. Разработаны методы молекулярно-генетического анализа для инвентаризации, паспортизации и оценки генетического потенциала объектов постоянной лесосеменной базы (лесосеменные плантации, архивы клонов и т.д.) березы карельской, дуба черешчатого, сосны обыкновенной и ели европейской.

Разработанные в настоящее время в институте методы анализа ДНК, включая технологии полимеразной цепной реакции, блот-гибридизации и секвенирования,

позволили не только получить новые данные о состоянии генетических ресурсов в естественных и искусственных лесных насаждениях, но и приступить к решению проблем ранее не доступных для лесного хозяйства. В первую очередь это касается возможности молекулярно-генетического диагностирования различных фитопатогенов, причем не только у пораженных деревьев, но и в воде, и почве [7]. Данное направление имеет важное значение не только для лесного хозяйства, но и для сельского хозяйства. Разработанные методы позволяют за несколько дней оценить наличие и степень зараженности фитопатогенами в питомниках, в теплицах и на полях. При этом с точным указанием, какими именно фитопатогенами заражена почва, что позволяет вовремя провести профилактические работы.

Во-вторых, необходимо отметить появившуюся возможность к выявлению и анализу конкретных генов, отвечающих за проявление хозяйственно-ценных признаков. При этом уже разработаны методы ранней диагностики хозяйственно-ценных форм растений. Это направление генетических исследований открывает новые перспективы в селекционной работе с лесообразующими видами [8].

Результаты проведенных исследований позволили доказать, что данные популяционной и молекулярной генетики могут и должны быть использованы при разработке и проведении мероприятий по сохранению генетических ресурсов лесообразующих видов. Генетические работы в институте не ограничиваются только прикладными проблемами. В результате проведенных исследований удалось подтвердить гипотезу о консервативности организации генетического материала у сосен и елей; установить степень естественного и искусственного мутагенеза у сосны обыкновенной и ели европейской; предложить варианты решения спорных вопросов систематики у сосен и елей на основе генетических критериев; доказать аллопатрический тип видообразования у хвойных видов и выявить этапы видообразования, с определением степени генети-

ческих различий на каждом этапе; построить генетические карты у ели европейской, сосны обыкновенной, сосны черной, сосны горной и кедрового стланика.

Большое внимание в институте уделяется поддержанию и расширению биотехнологических исследований. В настоящее время создана коллекция микроклональных клонов лесных ягодных растений и лесообразующих видов. При этом данная коллекция является наиболее полной на территории СНГ. Свидетельством этого являются заказы Федерального агентства лесного хозяйства России на разработку технологий микроклонального размножения древесных пород и предоставления им партий микроклональных растений. В институте получены клоны хозяйственно-ценных форм березы карельской и наиболее высокопродуктивные клоны березы и осины, что, в настоящее время, имеет большое значение для закладки так называемых энергетических плантаций, т.е. плантаций, направленных на обеспечение нашей республики энергией за счет использования местных видов топлива.

В заключение необходимо отметить еще одну проблему, исследования по которой ведутся в институте уже длительное время. Имеется в виду радиоактивное загрязнение территорий в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Исследования в данной области ведутся на трех различных уровнях: морфологическом, цитогенетическом и генетическом. Были исследованы различные морфологические мутации, которые возникают под воздействием радиоактивного излучения у древесных пород. Разработана тест-система, которая позволяет в течение нескольких дней получить оценку генетических последствий у хвойных растений в результате радионуклидного загрязнения территорий. На этой основе проведена оценка уровня радионуклидного мутагенеза у сосны и ели в различных районах республики. Изучены возникающие хромосомные aberrации у хвойных пород, установлены различные типы хромосомных нарушений и проведен анализ лесосемен-

ных объектов, находящихся на территориях в различной степени загрязненных радионуклидами. Это позволило в настоящее время приступить к разработке рекомендаций о возможности использования лесосеменных объектов, находящихся на загрязненных территориях.

Список использованных источников

1. Krutovskii K.V., Neale D. Forest genomics and new molecular approaches to measuring and conserving adaptive genetic diversity in forest trees // Conservation and management of forest genetic resources in Eastern Europe I. Conservation, evaluation, management and sustainable use of forest genetic resources: Proceedings of the International training programme, Gmunden, 30 April – 11 May 2001 / Austrian Training Centre. – Gmunden, 2001. – P. 5–33.

2. Падутов В.Е. Генетические ресурсы сосны и ели в Беларуси. — Гомель.: ИЛ НАНБ, 2001 – 144 с.

3. Орленко Е.Г. Методы ранней диагностики при оценке наследственных свойств плюсовых деревьев. М., 1972. — 1971. – 46 с.

4. Ковалевич А.И., Поджарова З.С., Сидор А.И. Методические рекомендации по созданию лесосеменных плантаций хвойных второго порядка. – Мн.: 1994, – 29 с.

5. Стратегический план развития лесного хозяйства Беларуси. – Мн.: МЛХ РБ, 1996. – 178 с.

6. Ковалевич А.И., Сероглазова Л.М. Этапы научных исследований по лесной селекции и семеноводству в Беларуси за 75 лет// Лесной науке в Беларуси – 75 лет. – Гомель, 1997. – С. 109–122.

7. Острикова М.Я., Баранов О.Ю., Падутов В.Е. Молекулярно-генетическая диагностика штаммов *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // Молекулярная и прикладная генетика: Научн. тр. Т. 1. – Мн., 2005. – С. 183.

8. Баранов О.Ю., Падутов В.Е. Рестрикционный анализ САD-гена ели европейской // Молекулярная и прикладная генетика: научн. тр. Т. 3.– Мн., 2006.– С.9-10

Дата поступления статьи 14 ноября 2007 г.

РЕФЕРАТЫ SUMMARIES

УДК 575/576(476)(092)+929

Хотылева, Л.В. Академик Н.В. Турбин – организатор и первый директор Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси / Л.В. Хотылева // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 6, Минск, 2007. С. 5-12.

Статья посвящена памяти Н.В. Турбина – академика Национальной академии наук Беларуси, академика Российской сельскохозяйственной академии, лауреата Государственной премии Белорусской ССР, заслуженного деятеля науки Белорусской ССР, выдающегося ученого в области генетики, селекции и растениеводства, основателя школы генетиков Беларуси, создателя Института генетики и цитологии Национальной академии наук и его первого директора. В статье оценивается роль Н.В. Турбина как ученого и организатора науки, который создал институт, определил его основные направления исследований, ясно предвидел перспективу их развития в будущем. Н.В. Турбин оставил большое наследие в генетической науке и благодарную память в сердцах многих людей.

Ключевые слова: академик Н.В. Турбин

Khotyleva, L.V. Academician N.V. Turbin – the founder and the first director of the Institute of Genetics and Cytology at the National Academy of Sciences of Belarus / L. Khotyleva // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 6. Minsk, 2007. P. 5-12.

The article is dedicated to the memory of N.V. Turbin – Academician of the National Academy of Sciences of Belarus, Academician of the Russian Agricultural Academy, a State prizewinner of the Byelorussian SSR, a Honoured Science Worker of the Byelorussian SSR, an eminent scientist in the field of genetics, breeding and plant growing, the founder of the school of Byelorussian geneticists, the founder of the Institute of Genetics and Cytology at the National Academy of Sciences of Belarus and its first director. The role of N.V. Turbin as a scientist and an organizer of science who has established the Institute, defined its major research trends and foreseen the prospect of their development in future is estimated in the article. N.V. Turbin has left the great heritage in genetic science and grateful memories in hearts of many people.

Key words: academician N.V. Turbin

УДК 575 : 63

Кильчевский, А.В. Генетические основы селекции растений / А.В. Кильчевский // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 6. Минск, 2007. С. 13-21.

Рассмотрены основные генетические приоритеты современной селекции: расширение спектра генетической изменчивости, повышение эффективности отбора, повышение информативности селекционного процесса, сокращение сроков создания сортов и гибридов. Обсуждаются разработанные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси биотехнологические методы в селекции растений: создание трансгенных организмов, использование молекулярных маркеров, клеточная и гаметная селекция, получение гаплоидов и др. Проведен анализ эффективности использования генетических методов в селекции сельскохозяйственных растений.

Ключевые слова: генетика и селекция растений, секалотритикум, трансгенные растения, RAPD-анализ, SSR-маркеры, пшеница, тритикале, рожь, картофель, томаты, перец, сахарная свекла, подсолнечник, соя.

Kilchevsky, A. Genetics principles of plant breeding / A. Kilchevsky // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 6. Minsk, 2007, P. 13-21.

The article concerns major genetic priorities of modern plant breeding which are as follows: broadening of a genetic variability spectrum, increase in selection efficiency, improvement of breeding process informativeness, and shortening of the terms for developing cultivars and hybrids. Biotechnological methods in plant breeding, worked out at the Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, are under discussion. They cover development of transgenic organisms and application of molecular markers; cell and gamete breeding; haploid production, etc. Efficiency and use of genetic methods in breeding of agricultural plants were analysed.

Key words: genetics and plant breeding, secalotriticum, transgenic plants, RAPD-analysis, SSR-markers, wheat, triticale, rye, potato, tomato, pepper, sugar beet, sunflower, soya.

УДК 576.311.348

Блюм, Я. Б. Геномика микротрубочек как инструмент для биотехнологии растений / Я. Б. Блюм, А. И. Емец, А. Ю. Ныпорко // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 6. Минск, 2007. С. 22-36.

Явление устойчивости растений к антимикротрубочковым соединениям рассмотрено с точки зрения функциональной и структурной геномики. Проанализирована взаимосвязь между мутациями в генах, кодирующих α - и β -субъединицы тубулина – основного структурного компонента микротрубочек, и изменениями в пространственной структуре соответствующих белков, следствием которых является пониженное сродство к динитроанилиновым и фосфоамидным соединениям – высокоспецифичным эффекторам тубулина растений. Особое внимание уделено получению линий растений мутантных по генам тубулинов и практическому использованию изменённых генов тубулина для переноса признака устойчивости к антимикротрубочковым веществам в другие сельскохозяйственные культуры и в качестве селективных маркерных генов.

Ключевые слова: геномика, иммунофлюоресцентный анализ, микротрубочки, биотехнология растений, тубулин, трансформация.

Blume. Ya. B. Microtubule genomics as tool for plant biotechnology / Ya. B. Blum, A. I. Yemets, A. Yu. Nyporko // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 6. Minsk, 2007. P. 22-36.

The plant resistance to antimicrotubular compounds have been considered from viewpoint of functional and structural genomics. The interrelation between mutations in genes coding α - and β -subunits of tubulin – main structural component of microtubules – and perturbations in spatial structure of corresponding proteins result in decreased affinity to dinitroaniline and phosphoramidate compounds – high specific effectors of plant tubulin – have been analyzed. The special attention have been paid to production of plant lines with mutant tubulin genes and practical application of modified genes to transfer the character of resistance to antimicrotubular substances into other crops and as selective marker genes.

Key words: genomics, immunofluorescent analysis, microtubules, plant biotechnology, tubulin, transformation.

УДК 577.21 086.83 : 581.143.6

Шейко, И.П. Перспективы использования ДНК-технологий в селекционной работе животноводства Беларуси / И.П.Шейко, Т.И. Епишко// Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 6. Минск, 2007. С. 37-44.

Выявлена возможность интенсивной селекции на повышение продуктивности животных на уровне генотипа по маркерным генам. Определены ДНК-маркеры, позволяющие вести отбор и подбор родительских пар на генном уровне, связанных с продуктивными качествами животных и детерминирующие мутации наследственных и инфекционных заболеваний свиней и крупного рогатого скота. Определены направления работ по проведению паспортизации племенного поголовья республики на основе создания банка ДНК.

Ключевые слова: маркерные гены, иммунодефицит, каппа-казеин, стрессочувствительность, породы свиней, крупный рогатый скот, мясные качества.

Sheiko, I. Prospects of applying DNA-technologies in cattle-breeding in Belarus / I. Sheiko, T. Yepishko // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 6. Minsk, 2007. P. 37-44

The possibilities of intensive breeding for rise in cattle productivity was revealed at the genotype level with marker genes. DNA markers enabling selection and choice of parental pairs at the gene level, related to productive qualities of animals and determining mutations of hereditary and infectious diseases of pigs and cattle were determined. Work trends of certifying breeding stock were defined on the basis of DNA bank creation in the republic.

Key words: markers genes, immunodeficiency, cappa-casein, stress-sensitivity, pig breeds, cattle, meat qualities.

УДК 575.2:575.224.2

Этногеномика белорусского народа. Предварительные итоги / О.Г. Давыденко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 6. Минск, 2007. С.45-78. Соавт. : Кушнеревич Е.И., Сивицкая Л.Н, Даниленко Н.Г.

В статье представлены результаты изучения полиморфизма молекулярных маркеров митохондриальной ДНК, Y-хромосомы и аутосом в популяции белорусов, а также сделаны выводы о формировании белорусского этноса с использованием данных о генетическом разнообразии современных белорусов.

Ключевые слова: этногеномика, митохондриальная ДНК, Y-хромосомы, генетическая структура популяции белорусов, гаплогруппы, полиморфизм, аутосомные маркеры.

Ethnogenomics of Belarusian. Preliminary results / O. Davydenko [et al.] // *Molecular and Applied Genetics : Proceedings*. Vol. 6. Minsk, 2007. P. 45-78. Kushnerovich E., Sivitskaya L., Danilenko N.

The results of studying polymorphism of molecular markers in Y-chromosomal, mitochondrial DNA and autosomes in Belarusians are presented in the report and the formation of Belarusians as an ethnic group is inferred using the data of genetic diversity in population of modern Belarusians.

Key words: ethnogenomics, mitochondrial DNA, Y-chromosome, genetic structure of Belorussian population, haplogroups, polymorphism, autosomic markers.

УДК: 577.321:577.214:57.052

Новый подход для экспрессии гетерологичных генов в растениях с целью создания устойчивых форм растений / В.С. Фадеев [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 6*. Минск, 2007. С. 79-80. Соавт. : Шимшилашвили Х.Р., Сотченков Д.В., Комахин Р.А., Бабыкин М.М.¹, Зинченко В.В.¹, Голденкова-Павлова И.В.

Сконструированы гибридные гены, несущие целевые гены *sd2*, *sd2mod*, *recA*, *cry3aM* и *prqA*, слитые в рамке считывания с последовательностью репортерного гена термостабильной лихеназы. Изучена экспрессия этих генов в клетках про- и эукариот. Показано, что в составе гибридных белков продукты целевых генов и репортерного гена сохраняют свои основные свойства.

Ключевые слова: устойчивость к стрессам, трансформация генов растений, экспрессия, репортерный ген, лихеназа.

A new approach to heterologic gene expression in plants for developing resistant plant forms / V. Fadeev [et al.] // *Molecular and Applied Genetics : Proceedings*. Vol. 6. Minsk, 2007. P. 79-80. Shimshilashvili X., Sotchenkov D., Komakhin R., Babikin M.¹, Zinchenko V.¹, Goldenkova-Pavlova I.

We have constructed hybrid genes, carrying the target gene *sd2mod*, *recA*, *cry3aM* and *prqA*, fused in the reading frame with reporter gene sequence of thermostable lichenase. The expression of hybrid genes was studied in pro- and eukaryotic cells. Products of target genes and the reporter genes were shown to maintain their basic properties in the composition of hybrid proteins.

Key words: stress resistance, plant gene transformation, expression, reporter gene, lichenase.

УДК 577.21 : 575.116.4 6 : 631.52

ДНК-маркеры в генетике и селекции растений / Н.А. Картель [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 6*. Минск, 2007. С.81-91. Соавт. : Малышев С.В., Урбанович О.Ю., Долматович Т.В.

В статье рассмотрены важнейшие направления использования ПДРФ и ПЦР методов создания молекулярно-генетических карт растений, основанных на ПДРФ маркерах, позволяющих давать высокоточную объективную характеристику генотипа сорта, т.е., генетический или ДНК-паспорт сорта в виде формул. Разработаны методические рекомендации по идентификации и паспортизации с помощью молекулярных маркеров сортов с/х культур на примере сортов мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы.

Ключевые слова: молекулярно-генетические карты растений, ДНК-маркеры, микросателлиты, мягкая пшеница, картофель, томат, лен, свекла.

DNA-markers in genetics and breeding of plants / N. Kartel [et al.] // *Molecular and Applied Genetics : Proceedings*. Vol. 6. Minsk, 2007. P. 81-91. Malyshev S., Urbanovich O., Dolmatovich T.

The article presents the most important trends of using RFLP and PCR methods for constructing molecular-genetic maps of plants based on RFLP markers giving a high accurate objective characteristic of cultivar genotype, i.e. genetic or DNA-certificate cultivar in the form of formulae. There are examples of effective application of DNA-markers for diagnostic purposes for wheat cultivars typing into hard grain-forming and short stalk-forming capacity; for determining resistance genes to brown rust in wheat cultivars

and scab in apple. An integrate molecular-genetic map of rye constructed by us, highly saturated by molecular markers as well as the results of identifying plant cultivars by DNA markers is given.

Key words: molecular-genetic maps of plants, DNA-markers, microsatellites, common wheat, potato, tomato, flax, beet.

УДК 575.856

Ермишин, А.П. Принципы и методы оценки риска генно-инженерной деятельности / А.П. Ермишин // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 6. Минск, 2007. С. 92-108.

В статье рассмотрены базовые принципы и методы оценки риска генно-инженерной деятельности на здоровье человека и окружающую среду.

Ключевые слова: генно-инженерные организмы, чужеродная ДНК, фактор риска, биобезопасность генно-инженерной деятельности.

Ermishin, A. Principles and methods for estimating risk of gene-engineering activities / A. Ermishin // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 6. Minsk, 2007. P. 92-108.

The article concerns basic principles and methods for estimating risk of gene-engineering activities of the human health and environment.

Key words: gene-engineering organisms, alien DNA, risk factor, biosafety of gene-engineering activity.

УДК 630*165.3

Селекционно-генетические основы рационального использования и сохранения лесных ресурсов / Ковалевич, А.И. [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 6. Минск, 2007. С. 109-114. Соавт. : Падутов В.Е., Сидор А.И., Баранов О.Ю.

Изложены основные направления селекционно-генетических исследований проводимых в Институте леса НАН Беларуси. Представлены основные результаты по рациональному использованию и сохранению лесных генетических ресурсов. Приведены новые перспективные направления использования ДНК-маркеров.

Ключевые слова: лесные генетические ресурсы, ДНК-маркеры, фенотип, генетические карты, ДНК-диагностика фитопатогенов, популяционная генетика, ель европейская, сосна обыкновенная, сосна черная, кедровый стланик.

Breeding-genetic principles of rational use and preservation of forest resources / A. Kovalevich [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 6. Minsk, 2007. P.109-114. Padutov V., Sidor A., Baranov O.

The paper presents basic trends of breeding-genetic investigations pursued at the Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus. Major results of rational use and presentation of forest genetic resources are given. New promising trends of using DNA markers are presented.

Key words: forest genetic resources, DNA-markers, phenotype, genetic maps, DNA-diagnostics of phytopatogens, population genetics, common spruce, common pine, mountain pine.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ

Статьи должны быть написаны в жатой и ясной форме и содержать:

- соответствующий индекс универсальной десятичной классификации литературы (УДК);
- название на русском и английском языках;
- инициалы и фамилии авторов на русском и английском языках;
- полное название учреждений, в которых выполнялось исследование и их почтовые адреса;
- ключевые слова (3...5 слов);
- аннотацию на русском и английском языках (100-150 слов). Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи.
- текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки ВВЕДЕНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ, РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ, ЗАКЛЮЧЕНИЕ);
- список использованных источников;
- дату поступления статьи в редакцию.

1. Объем статьи должен составлять не менее $\frac{117}{1000}$ знаков, включая пробелы. Последняя страница статьи должна быть заполнена не менее чем на 4/5(!). После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентичного содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на дискете) и на бумажном носителе в 1 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) и *рецензию* на статью.
2. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS-Word. Объем статьи – не менее 14 000 зн. Название файлов – фамилия первого автора латинскими буквами.
3. Формат бумаги А4 (297 x 210 мм), ориентация - книжная.
4. Поля: верхнее – 2,5 см, нижнее - 2,5 см, левое – 2,5 см, правое -2,5 см.
5. Основной текст статьи набирается в одну колонку. Шрифт Times New Roman, размер 12 пт. Межстрочный интервал - 12 пт. Выравнивание – по ширине.
6. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.
7. Автоматическая расстановка переносов обязательна.
8. Название статьи набирать ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.
9. 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).
10. 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». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются *курсивом*. Математические формулы (\lim , \sum , \sin , и т. д.) и цифры набираются прямым начертанием.
11. 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.
12. Кавычки по всей работе должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбивают от заключенных в них слов.
13. 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. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, *не допускается использование сканированного текста*.
14. Фотоиллюстрации должны иметь разрешение 600 dpi (черно-белый, gray), 300 dpi (полноцв.) и формат TIFF.
15. Список цитированных источников (оформляется в соответствии с Правилами ВАК, Приложение2) 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 6, 2007**

Верстка В.И. Серeda
Перевод Г.А. Мартысь

Подписано в печать 20.12.2007. Формат 60x84 1/8.
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Трафаретная печать.
Усл. печ. л. 13,95. Уч.-изд. л. 8,49.
Тираж 100 экз. Заказ 50.

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

Отпечатано на ризографе
УП Камет, г. Минск, ул. Кульман, 27-ба.