

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**«Актуальные проблемы генетики
и молекулярной биологии»
в рамках фестиваля науки»**

МАТЕРИАЛЫ

всероссийской молодежной конференции
в рамках Федеральной целевой программы
«Научные и научно-педагогические кадры
инновационной России» на 2009-2013 годы

(Уфа, Россия, 24-28 сентября 2012 г.)

УДК 636
ББК 45/46
А 43

Ответственный за выпуск:
канд. с.-х. наук, доцент,
проректор по научной и инновационной деятельности
ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ **И. Г. Асылбаев**

Редакционная коллегия:
д. б. н., проф. **Ю. А. Янбаев**
д-р с.-х.н., профессор **Р. Р. Султанова**
канд. биол. н. **А. А. Музафарова**
канд. биол. н. **А. А. Габитова**

А 43 «Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии» в рамках фестиваля науки». Материалы научных докладов участников всероссийской молодежной конференции в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (Уфа, Россия, 24-28 сентября 2012 г.). – Уфа: Башкирский ГАУ, 2012. – 256 с.

ISBN 978-5-7456-0317-4

В сборнике приведены материалы докладов участников всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии» в рамках фестиваля науки», проводимой в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

Статьи приводятся в авторской редакции. Авторы несут ответственность за патентную чистоту, достоверность и точность приведенных фактов, цитат, экономико-статистических данных, собственных имен, географических названий и прочих сведений, а также за разглашение данных, не подлежащих открытой публикации.

УДК 636
ББК 45/46

ISBN 978-5-7456-0317-4

© ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, 2012

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ГЕНЕТИКЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

УДК: 577.21:633.11:57.085.2

Антоненко Е.В.

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», г. Минск

SSR АНАЛИЗ ЛОКУСОВ 5А ХРОМОСОМЫ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ У ГЕНОТИПОВ, КОНТРАСТНЫХ ПО ОТЗЫВЧИВОСТИ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ

Ключевые слова: культура клеток; пыльники; мягкая пшеница; локусы; микросателлиты.

Введение. В последнее время появляется все больше работ, посвященных поиску генетических маркеров, связанных с процессами регенерации растений в культуре *in vitro* [1,2]. В работах Mano et al. и Bregitzer et al. с использованием линий удвоенных гаплоидов от скрещивания сортов ячменя *Steptoe* и *Morex* были найдены пять локусов QTL, влияющих на число зеленых растений-регенерантов в культуре пыльников, а также два QTL, связанные с регенерацией альбиносных растений [2,3]. В исследованиях Torp et al. с использованием пятидесяти линий удвоенных гаплоидов от скрещивания двух сортов пшеницы *Ciano* и *Walter*, на хромосомах 2AL, 2BL и 5BL было найдено четыре QTL, влияющих на частоту формирования зеленых растений-регенерантов [4]. Три аллеля, выявленные на хромосомах 2AL и 2BL, были получены от отзывчивого сорта *Ciano*. Благоприятствующий формированию зеленых растений locus количественных признаков, расположенный на хромосоме 5BL, был передан от низко отзывчивого родителя *Walter*. Вместе с тем не было показано достоверного влияния исследованных локусов на формирование эмбриоидов, что еще раз подтверждает независимый контроль отдельных параметров пыльцевого эмбриогенеза.

Таким образом, несмотря на то, что индукция пыльцевого эмбриогенеза у растений лежит в основе многих современных биотехнологий, эффективность и масштабы применения этих подходов существенно снижены. Одной из причин является тот факт, что несмотря на появление в последнее время все большего числа научных работ, посвященных поиску генетических маркеров, связанных с индукции морфогенеза в культуре *in vitro*, до настоящего времени не идентифицированы гены, контролирующие описанные процессы.

Цель и задачи исследования. Целью данного научного исследования является поиск молекулярных маркеров генов, детерминирующих высокий эмбриогенный потенциал пшеницы в культуре *in vitro*, для последующего определения их хромосомной локализации. Задачи включают подбор подходящих микросателлитных локусов и оценку их полиморфизма у

контрастных по отзывчивости в культуре *in vitro* генотипов мягкой яровой пшеницы.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовались 2 сорта мягкой яровой пшеницы белорусской селекции (Ростань, Рассвет), обладающие низкой андрогенетической способностью в культуре пыльников, и 2 линии удвоенных гаплоидов мягкой яровой пшеницы (Dh 52-02-06, Dh 48-02-06), полученные методом культуры пыльников в лаборатории генетики и клеточной инженерии растений ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» и показавшие высокий андрогенетический потенциал в культуре *in vitro*.

Растения выращивали на экспериментальном поле Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Образцы высевались вручную. Посев осуществлялся в трех повторностях. Площадь учетной делянки – 1 м². Высевали 5 рядков по 20 зерен на рядок (1 м), ширина междурядий – 20 см. В теплице растения высевали в сосуды с землей из расчета 10 растений на сосуд, в 3-х повторностях.

Молекулярно-генетическая оценка аллельного состава генов. Выделение ДНК. Выделение ДНК проводили из листьев растений пшеницы по методике Дорохова и Клоке [5]. Для анализа полиморфизма использовали праймеры к микросателлитным локусам, расположенным на 5 хромосоме А генома мягкой яровой пшеницы, указанные в таблице 1. Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР подобраны с использованием базы данных GrainBase 2.0 [6].

Таблица 1 – Последовательности праймеров к микросателлитным локусам, расположенным на хромосоме 5А мягкой яровой пшеницы.

Локус	Последовательность праймеров
<i>1</i>	<i>2</i>
Xgwm304	5' AGGAAACAGAAATATCGCGG 3' 5' AGGACTGTGGGGAATGAATG 3'
Xgwm415	5' GATCTCCCATGTCCGCC 3' 5' CGACAGTCGTCACCTTGCCTA 3'
Xgwm154	5' TCACAGAGAGAGAGGGAGGG 3' 5' ATGTGTACATGTTGCCTGCA 3'
Xgwm293	5' TACTGGTTCACATTGGTGCG 3' 5' TCGCCATCACTCGTTCAAG 3'
Xgwm205	5' CGACCCGGTTCACCTTCAG 3' 5' AGTCGCCGTTGTATAGTGCC 3'
Xgwm156	5' CCAACCGTGCTATTAGTCATTC 3' 5' CAATGCAGGCCCTCCTAAC 3'
Xgwm595	5' GCATAGCATCGCATATGCAT 3' 5' GCCACGCTTGGACAAGATAT 3'

<i>1</i>	<i>2</i>
Xgwm186	5' GCAGAGCCTGGTTCAAAAAG 3' 5' CGCCTCTAGCGAGAGCTATG 3'
Xgwm126	5' CACACGCTCCACCATGAC 3' 5' GTTGAGTTGATGCGGGAGG 3'
Xgwm291	5' CATCCCTACGCCACTCTGC 3' 5' AATGGTATCTATTCCGACCCG 3'

Программа для проведения ПЦР:

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

3 минуты при 94 С°; 1 минута при 94 С°, 1 минута при 55 С°, 2 минуты при 72 С° (45 циклов); 10 минут 72 С° [6].

Для праймеров к локусам Xgwm205 Xgwm156 Xgwm595 Xgwm186 Xgwm126 Xgwm291:

3 минуты при 94 С°; 1 минута при 94 С°, 1 минута при 60 С°, 2 минуты при 72 С° (45 циклов); 10 минут 72 С° [6].

Электрофорез полученных продуктов амплификации проводили в 6% полиакриламидном геле при напряжении 40-100 вольт. Окраска геля проводилась в растворе бромистого этидиума.

Результаты исследования. Данные о генетическом контроле отзывчивости растений к культивированию тканей, в частности, о генах, контролирующих пыльцевой эмбриогенез отрывочны и достаточно противоречивы [7,8,9,10]. Решить эту проблему могут современные методы картирования геномов. Одним из них является определение сцепления микросателлитных маркеров и исследуемых признаков в популяциях родителей и гибридов второго поколения. Он позволяет определить хромосомную локализацию целевого гена с точностью до нескольких сМ [11].

Для идентификации генов, определяющих способность растений к индукции пыльцевого эмбриогенеза, и их картирования с помощью микросателлитных маркеров необходимо осуществить корректный подбор конструирование соответствующих праймеров. Из-за большого числа хромосом не представляется возможным вести поиск соответствующих маркеров по всему геному. Поскольку получены данные о том, что на эффективность индукции пыльцевого эмбриогенеза и регенерации растений пшеницы оказывают заметное влияние хромосомы 5 гомеологической группы [7,8,9], основное внимание в данном исследованиях было сосредоточено на исследовании генов, локализованных на хромосоме 5А. Данная хромосома с картированными микросателлитными последовательностями представлена на рисунке 1.

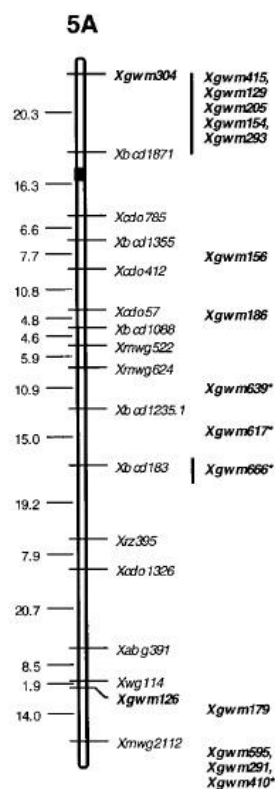


Рисунок 1 – Генетическая карта хромосом 5А и 5В мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) [12].

Отобранные нами для использования в дальнейших исследований маркеры микросателлитных локусов представлены в таблице 2. Детальный анализ имеющейся в литературе информации показал, что основное число микросателлитов имеют сходные локусы в нескольких хромосомах генома. Чтобы повысить точность исследований нами были подобраны 10 маркеров, локализованных исключительно на хромосоме 5А.

Таблица 2 – Микросателлитные локусы хромосом 5А мягкой яровой пшеницы

Локус	Положение
Xgwm304	5AS
Xgwm415	5AS
Xgwm154	5AS
Xgwm205	5AS
Xgwm293	5AS
Xgwm156	5AL
Xgwm595	5AL
Xgwm186	5AL
Xgwm126	5AL
Xgwm291	5AL

Как видно из рисунка 1 и таблицы 2, отобранные микросателлитные локусы равномерно расположенных в различных районах хромосом 5А. Все они представлены единичными копиями на соответствующей хромосоме.

Для каждого локуса подобраны соответствующие праймеры и оптимизированы условия проведения ПЦР.

Полученные данные свидетельствуют о наличии межлинейного полиморфизма по локусам Xgwm186 (рисунок 2) и Xgwm291 (рисунок 3) Xgwm595 (рисунок 4) у изучаемых генотипов. На всех рисунках цифрами 1-5 обозначен сорт Ростань, 6-10 – сорт Рассвет, 11-15 – удвоенный гаплоид Dh 52-02-06, удвоенный гаплоид Dh 48-02-06. Для остальных исследованных локусов полиморфизм выявлен не был.

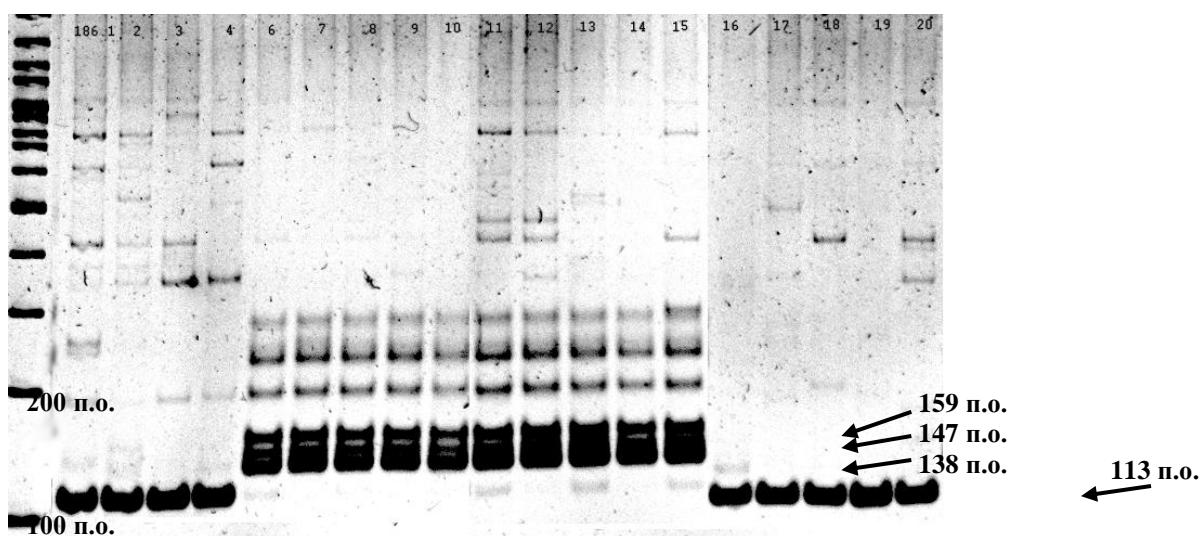


Рисунок 2 – Межлинейный полиморфизм по локусу Xgwm186 у сортов и линий мягкой яровой пшеницы.

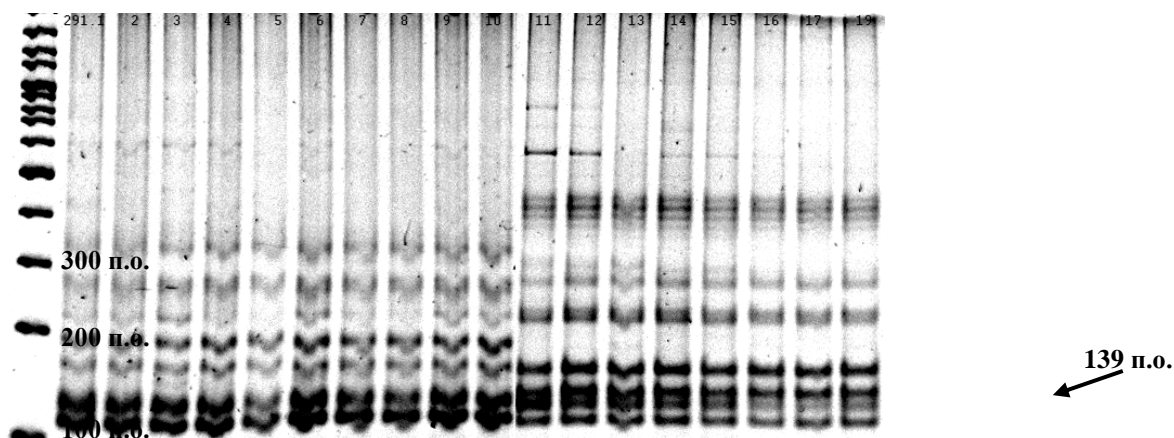


Рисунок 3 – Межлинейный полиморфизм по локусу Xgwm291 у сортов и линий мягкой яровой пшеницы.

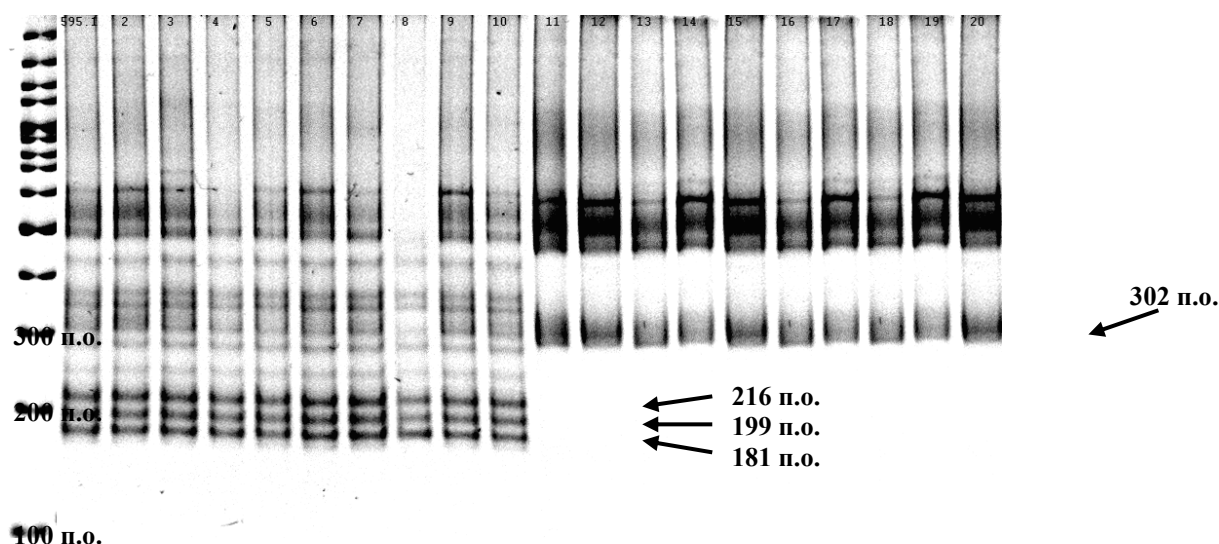


Рисунок 4– Межлинейный полиморфизм по локусу Xgwm595 у сортов и линий мягкой яровой пшеницы.

При изучении полиморфизма локуса Xgwm186 у сорта Ростань и удвоенного гаплоида Dh 48-02-06 был выявлен фрагмент размером 113 п.о., у сорта Рассвет и удвоенного гаплоида Dh 52-02-06 выявлялось 3 фрагмента размером 159, 147 и 138 п.о. Полиморфизм по локусу Xgwm291 проявился в наличии дополнительного фрагмента размером 139 п.о. у линий удвоенных гаплоидов, отсутствующего у исследованных сортов. Анализ полиморфизма локуса Xgwm595 выявил наличие 3 фрагментов у обоих исследованных сортов (размер 216, 199, 181 п.о.) и единственного фрагмента размером 302 п.о. для линий Dh 52-02-06 и Dh 48-02-06.

Выводы. Таким образом, анализ полученных данных подтвердил наличие полиморфизма по 3 из 10 исследуемых локусов. Поскольку изученные генотипы являются контрастными по эффективности пыльцевого эмбриогенеза *in vitro* (сорта обладают низкой отзывчивостью, линии – высокой), можно говорить о том, что наличие определенных локусов может коррелировать с отзывчивостью генотипов в культуре *in vitro*.

Библиографический список

1. Genetic mapping of QTL controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers. / I.M. Ben Amer et al.. – Theor Appl Genet. – 1997. – V.94(8). – P. 1047-1052.
2. Bregitzer, Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley callus. / P. Bregitzer, R.D. Campbell. – Crop Science. – 2001. – V. 41. – P. 173-179.
3. Construction of a genetic map of barley (*Hordeum vulgare* L.) cross 'Azumamugi' x 'Kanto Nakate Gold' using a simple and efficient amplified fragment-length polymorphism system. / Y. Mano et al.. – Genome. – 2001. –V. 44. – P. 284-292.

4. Torp, A.M. Chromosomal region associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. / A.M. Torp, A.L. Hansen, S.B. Andersen. – *Euphytica*. – 2001. – V. 119. – P. 377-387.
5. Дорохов, Д.Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д.Б. Дорохов, Э. Клоке. – *Генетика*. – 1997. – Т. 33. – № 4. – С. 443-450.
6. GrainGenes 2.0: a data base for Triticeat and Avena [Electronic resource] – Mode of access: <http://wheat.pw.usda.gov>. – Date of access: 26.09.2012.
7. Tuveesson, K.D. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture / K. D. Tuveesson, S. Pedersen, S.B. Andersen. – *Theor. Appl. Genet.* – 1989. – V. 78. – P.879-883.
8. Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. / S. Agache et al.. – *Theor. Appl. Genet.* – V. 77. – P. 7-11
9. Henry, Y. Genetic analysis of in vitro wheat somatic embryogenesis. / Y. Henry, J. Buysier, L. Marcotte. – *Euphytica*. – 1985. – V. 63. – № 3. – P. 265-270.
10. Ghaemi, M. Reciprocal substitution analysis of embryo induction and plant regeneration from anther culture in wheat. / M. Ghaemi, A. Sarrafi, R. Morris. – *Genome*. – 1995. – V. 38. – P. 158-165.
11. Linkage mapping of mutant loci in rye (*Secale cereale* L.) / Malyshev S. et al.. – *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – V. 103. – P. 70-74.
12. Rцder, M.S. Wheat microsatellites in plant breeding-potential and implications. In: *Molecular markers in plant breeding*. / M.S. Rцder et al. – Springer-Verlag Heidelberg. – P. 255-266.

УДК 575.17

Байрамгулов Н.Р.

ФГБОУ ВПО Зауральский филиал Башкирский ГАУ, г.Сибай, Россия

МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ РОДИОЛЫ ИРЕМЕЛЬСКОЙ (*RHODIOLA IREMELICA* BORISS.).

Введение. В настоящее время очевидным является утверждение, что для сохранения редких и исчезающих видов важно предотвратить уменьшение генетического разнообразия [7]. При этом считается, что чем выше разнообразие, тем больше шансов для выживания в постоянно меняющихся условиях окружающей среды. Другими словами, сохранение генофонда тесно связано с сохранением генетического разнообразия популяций [2], определяющим потенциал для адаптации и эволюции.

Одним из удобных тест-объектов для экспериментального исследования и вклада в теоретическое обобщение проблем сохранения генофонда редких и исчезающих видов растений является родиола иремельская *Rhodiola iremelica* Boriss. Это эндемичный на Южном Урале и ранее не изученный с популяционно-генетической точки зрения вид, находящийся под охраной Красной книги Башкортостана. Он обитает в горной части Республики и

представлен фрагментированными изолированными местообитаниями, в разной степени затронутых антропогенным вмешательством.

Большая популярность растения обусловлена попытками создания сырьевых баз золотого корня [4], и выращивание в индивидуальных хозяйствах для личного потребления. Однако введение его в культуру и распространение осуществляется бессистемно, с использованием случайного посадочного и семенного материала. Есть еще одна причина, из-за которой представляет актуальность изучение популяций родиолы ирмельской – вид из-за своей малочисленности и хищнических заготовок в природных местообитаниях относится к особо охраняемым объектам. При проведении таких исследований необходимо учесть, что популяции любого вида являются элементарной единицей эволюционного процесса и обладают уникальным генофондом, сложившимся в ходе отбора в течение многих поколений. Генетическое разнообразие популяций, пространственная, возрастная и половая структуры популяции определяют их устойчивость, способность к адаптации и возможность выживания в изменяющихся условиях среды, в том числе в условиях введения в культуру.

Общее число известных местообитаний родиолы ирмельской на территории республики Башкортостан – 48. [3]. Несмотря на принимаемые меры по охране, в результате хищнических заготовок вид на территории республики подведен к грани вымирания. Кроме антропогенных причин в сокращении численности вида в природе в настоящее время начинают играть заметную роль и естественные. Так, в нескольких пунктах на хр. Машак отмечено наступление леса на сообщества горных тундр, в которых произрастает р. ирмельская. Наметившийся в последние десятилетия в высокогорьях Южного Урала процесс поглощения гольцовой растительности лесами связан с общим потеплением климата [5].

Целью данной работы является оценка соотношения компонент межвыборочной изменчивости родиолы ирмельской различных иерархических уровней (внутри местообитания, между предполагаемыми субпопуляциями одного хребта, между популяциями различных хребтов).

Материалы и методы исследований

В качестве метода лабораторных анализов выбран полиакриламидный диск-электрофорез в щелочном разделяющем геле [9]. Изоферменты, использованные в качестве маркеров популяционного разнообразия, обладают рядом достоинств - онтогенетической стабильностью, кодоминантным наследованием аллозимов, относительно простой дешифровкой фенотипов, производительностью анализов.

Показатель F-статистики Райта F_{st} [11] вычисляли с использованием компьютерной программы BIOSYS-1 [10]. Параметр показывает, какую долю общей изменчивости охватывает межпопуляционная ее компонента.

В качестве маркеров для характеристики популяционных структур нами использованы изоферменты.

Для изучения отобранны выборки из 21 природных популяций родиолы иремельской *Rhodiola iremelica* Boriss., расположенных на горном массиве Иремель, хребтах Уралтау и Крыкты.

Результаты и их обсуждение

Во всех изученных выборках и 8 полиморфных локусах нами обнаружено 34 аллеля. Наиболее распространенная аллель в целом является общей для всех выборок для 5 полиморфных локусов (Aat-2, bPgdh-1, Mdh-1, Mdh-3, Aap-1), хотя разброс частот частых аллелей оказался довольно большим. Для остальных трех локусов в целом наиболее частый аллель оказывался в меньшинстве хотя бы в одной выборке (у 5 выборок в Aat-1, у 2 – в Dia-1, у 1 - в Aat-3). Таким образом, различия в аллельном составе касаются не только относительно редких, как это в целом характерно для популяций перекрестноопыляющихся растений [7], но и частых аллелей.

Обращает на себя внимание, что «отклоняющиеся» по частоте варианты выявлены в разных локусах и в разных 6 выборках. В тех местообитаниях, где частый аллель превышает 50 %, разброс частот также значителен. Что касается относительно редких ($P < 10\%$) аллелей, то они представлены у 1-6 изученных выборок. Например, аллели Aat-1 (частота 0.016), Aat-2, Aat-3 и Dia-1 выявлены только в выборках Ir2, Ur2-2, Kr2 и Kr9, соответственно. При этом чаще та или иная выборка обладает «своим» редким аллелем, не имеющимся на других участках. Все это привело к тому, что гетерогенность аллельных частот при его вычислении для всех выборок статистически высоко достоверна ($P < 0.001$).

Для анализа причин, приводящих к различиям частот наиболее часто встречающихся аллелей и генотипов в изучаемых выборках, нами был проведен анализ их изменений по разным градиентам (север-юг, по высоте над уровнем моря), приуроченности к тем или иным экологическим условиям. Ни в одном из этих анализов каких-либо закономерностей не наблюдалось. Выявленные различия частот генотипов и аллелей обусловлены, вероятно, лишь статистическими причинами из-за разной и в большинстве случаев очень малой численности особей в местообитаниях.

Соответствие наблюдаемых распределений генотипов ожидаемым при равновесии Харди-Вайнберга по каждому локусу проверялось двумя способами: по всем обнаруженным генотипам в локусе (критерии χ^2 и G) и с объединением генотипов в классы (гомозигота по основному аллелю, гетерозигота по основному аллелю и все другие генотипы). В первом случае (табл. 1.) из 168 проведенных оценок в 16 выявлены достоверные отклонения наблюдаемых распределений от ожидаемых на разных уровнях значимости (9.5 %). При использовании G – модифицированного для полиаллельных локусов и малых ожидаемых численностей (<3) теста [1] число отклонений меньше (6.6 %) и они обнаружены на более низких уровнях значимости. Объединение

генотипов в отдельные классы позволило выявить отклонения еще в меньшем числе случаев (4.8 %). Тем не менее, недостаток той или иной группы генотипов показывает, что в популяциях родиолы ирмельской нет сбалансированности состава генотипов, а скрещивание носит «неслучайный» характер. Чаще всего, согласно теории, это явление наблюдается при ограниченности объема выборки, т.е. численности популяции. Особенно это справедливо для ирмельских выборок (где отклонения выявлены во всех выборках и на высоких уровнях значимости), где из-за хищнических заготовок в последние десятилетия резко снизилась численность популяции. В остальных группах популяций из разных хребтов чаще наблюдаемые и теоретически ожидаемые численности генотипов совпадали.

Как и частота аллелей, значения параметров генетического разнообразия в популяциях значительно различаются. Для среднего числа аллелей на локус эти изменения составили 2.0 – 3.0, полиморфизм изменялся от 75 до 100 %, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность – от 0.167 до 0.371 и от 0.155 до 0.457, соответственно. При анализе гетерозиготности отдельных локусов выявляется еще больший уровень изменчивости.

Таблица 1 Статистическая оценка отклонение частот генотипов от правила Харди-Вайнберга

Выборки	Локус	Критерии		
		χ^2	G	C объединением генотипов в классы
IrM1-1	Mdh-1	7.1 **	6.6 *	-
IrM1-2	Aat-1	11.7 ***	9.2 **	-
IrM2	Aap	11.0 ***	6.7 **	-
IrM3	Mdh-1	6.5 *	5.7 *	-
Ur1	Dia	15.0 *	6.8 n.s.	0.404 n.s.
Ur2-1	Aat-3	4.0 *	3.6 n.s.	-
Ur2-2	Aat-3	10.3 *	6.2 n.s.	4.325 n.s.
	Mdh-3	7.6 **	7.1 **	-
Kr1	Aap	11.6 **	8.3 *	2.599 n.s.
Kr2	Mdh-1	4.7 *	4.0 *	-
Kr4	Aap	10.1 *	4.9 n.s.	0.243 n.s.
Kr6	Mdh-3	5.9 *	4.4 *	-
Kr9	Aat-1	26.3 ***	10.2 *	2.789 n.s.
Kr10	Dia	3.9 *	4.0 *	-
KrI	Aat-1	4.9 *	4.4 *	0.480 n.s.
	бpgdh	12.1 **	5.5 n.s.	-

Примечание: символами *, ** и *** обозначены отклонения, достоверные на уровнях значимости $P < 0.05$, 0,01 и 0.001, соответственно; n.s. – отклонения статистически недостоверны.

Необходимо отметить, что тестирование с объединением генотипов в классы возможно только для полиаллельных локусов. По этой причине в последней колонке таблицы для отдельных локусов и выборок нет сведений.

В большинстве выборок наблюдаются положительные значения индекса фиксации Райта, что свидетельствует о значительном влиянии инбридинга и/или статистических причин на генетическую структуру. В 18 выборках $F > 0$ и лишь в 3 выборках величины F отрицательные. Об этой же закономерности свидетельствуют коэффициенты инбридинга особей относительно популяции и вида в целом, вычисленные с использованием F -статистики Райта ($F_{is} = + 0.059$ и $F_{it} = + 0.167$).

Анализ подразделенности выборок показал, что по 8 полиморфным локусам в среднем 88.5 % всей изменчивости относится к внутривыборочной и 11,5 % - к межвыборочной. По литературным сведениям [7] ниже приводятся значения параметра генетической подразделенности – G_{st} (аналога использованного нами показателя F_{st}) для растений различных категорий, куда можно отнести и родиолу ирмельскую.

Были установлены следующие величины параметра для видов лесной и лесостепной зоны ($F_{st} = 0.038$), покрытосеменных ($F_{st} = 0.073$), насекомоопыляемых видов ($F_{st} = 0.099$), находящихся на поздней стадии сукцессии ($F_{st} = 0.080$), с широкими ареалами ($F_{st} = 0.033$) или эндемичных ($F_{st} = 0.141$), возобновляющихся одновременно вегетативным/семенным способом ($F_{st} = 0.051$), распространяющих семена при помощи ветра ($F_{st} = 0.076$). Родиола ирмельская ($F_{st} = 0.115$) обладает более высокой генетической дифференциацией популяций, по сравнению с большинством вышеприведенных категорий. В то же время ее популяции подразделены меньше, чем это характерно для видов-эндемиков с $F_{st} = 0.141$ [7].

Нами не выявлено существование каких-либо закономерностей между уровнем подразделенности выборок и расстоянием между ними. Для наглядности этого вывода приведен рис. 1.

Для того, чтобы количественно оценить, насколько близки друг к другу исследованные выборки, нами использовался коэффициент генетической дистанции Нея (D), который учитывает разницу, существующую в частотах всех аллелей [8]. Для обеспечения наглядности демонстрации результаты приведены в виде дендрограммы (Рис. 2.).

Видно, что, несмотря на довольно высокий в целом уровень кластеризации, в распределении выборок нет каких-либо закономерностей по их географической удаленности друг от друга, в трансекте север-юг или по приуроченности выборок к той или иной группе экологических условий. Другими словами, расположение выборок на дендрограмме носит «хаотичный» характер.

Целью дальнейшего анализа является оценка соотношения компонент межвыборочной изменчивости родиолы ирмельской различных иерархических уровней (внутри местообитания, между предполагаемыми субпопуляциями одного хребта, между популяциями различных хребтов). Объединение в группы проведено на основании географических расстояний.

В трех группах близкорасположенные выборки в пределах отдельных местообитаний дифференцированы на небольших уровнях (таблица 2.), причем на разных местностях (хребты Уралтау, Ирандык и горный массив Иремель) получены практически одинаковые величины подразделенности ($F_{st} = 0.033 - 0.034$, $D = 0.023 - 0.029$).

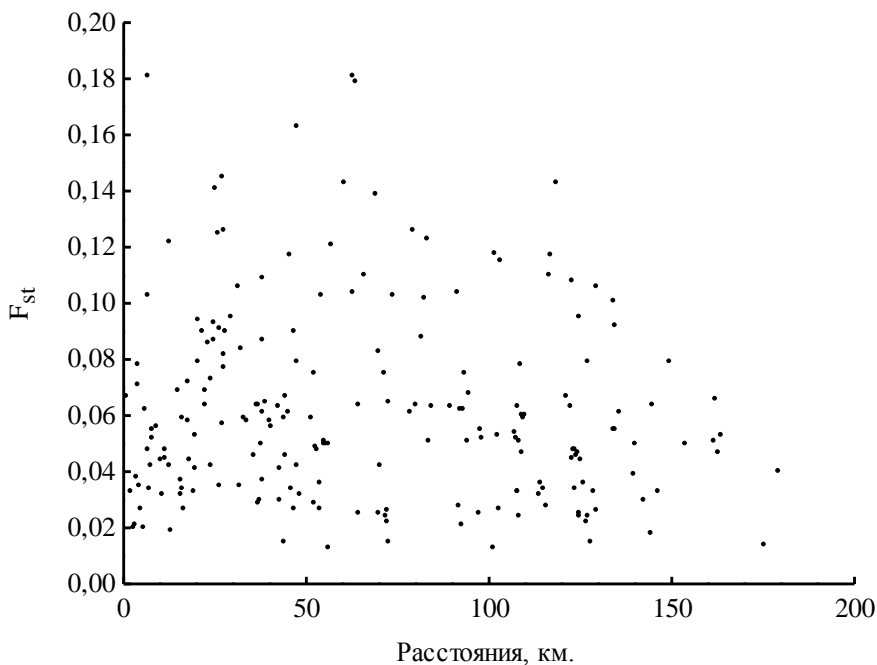


Рис. 1. Географические расстояния и коэффициент дифференциации F_{st} между парами выборок

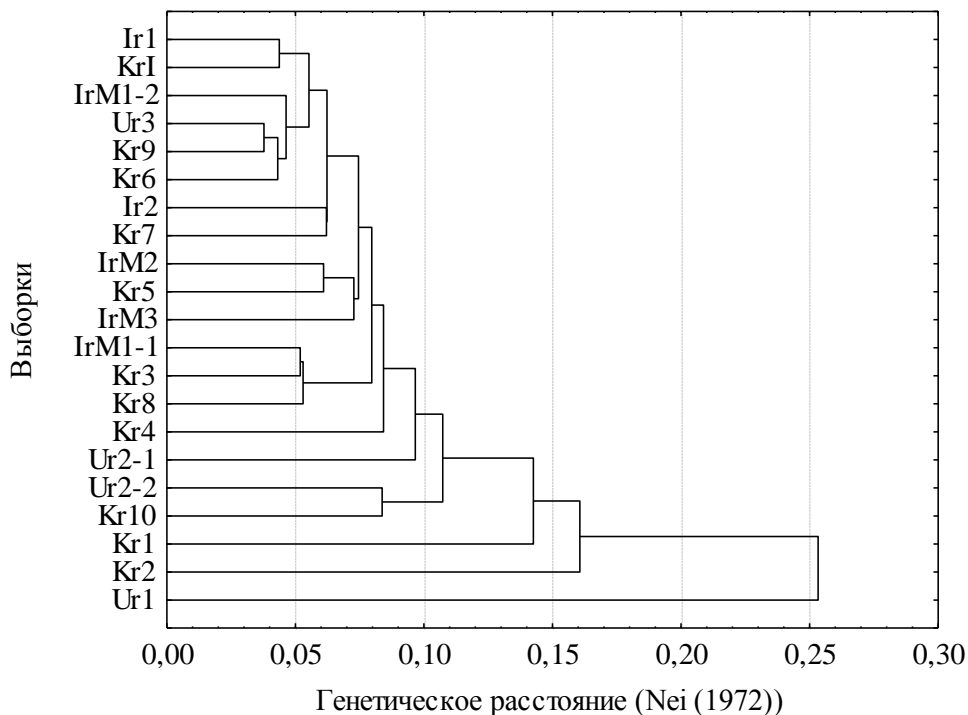


Рис. 2. Генетическое расстояние между выборками родиолы иремельской

Этот уровень для выборок одного местообитания довольно высок и находится на уровне различий географически разделенных популяций видов с широкими ареалами и с $G_{st} = 0.033$ [7]. Тем не менее субпопуляции в пределах местообитания, несмотря на их пространственную (< 1 км) изоляцию, не успели дивергировать. Видимо, этот процесс начался в относительно недавнем прошлом.

Таблица 2 Дифференциация групп выборок в пределах местообитаний

Группы выборок	Локусы	F_{st}	D_{cp}
Ur2-1, Ur2-2	Aat-1	0.003	0.027
	Aat-2	0.025	
	Aat-3	0.029	
	Dia-1	0.081	
	6Pgdh	0.043	
	Mdg-3	0.016	
	Mdh-1	0.078	
	Aap	0.010	
	В среднем	0.034	
IrM1-1, IrM1-2	Aat-1	0.035	0.029
	Aat-2	0.023	
	Aat-3	0.076	
	Dia-1	0.002	
	6Pgdh	0.033	
	Mdg-3	0.040	
	Mdh-1	0.084	
	Aap	0.006	
	В среднем	0.033	
Ir1, Ir2	Aat-1	0.025	0.023
	Aat-2	0.002	
	Aat-3	0.067	
	Dia-1	0.068	
	6Pgdh	0.031	
	Mdg-3	0.017	
	Mdh-1	0.015	
	Aap	0.044	
	В среднем	0.035	

На более высоких иерархических уровнях объединения выборок значения генетической подразделенности намного выше. Так, для групп выборок из близлежащих местообитаний $F_{st} = 0.056 - 0.067$, $D = 0.030 - 0.047$ (таблица 3.), а при сравнении групп выборок из разных хребтов дифференциация находится уже на уровне $F_{st} = 0.095 - 0.115$, $D = 0.030 - 0.047$.

Таблица 3 Дифференциация групп выборок близкорасположенных местообитаний

Группы выборок	Локусы	F_{st}	Dcp
IrM1-1, IrM1-2, IrM2, IrM3	Aat-1	0.095	0.030
	Aat-2	0.016	
	Aat-3	0.101	
	Dia-1	0.029	
	6Pgdh	0.056	
	Mdg-3	0.087	
	Mdh-1	0.048	
	Aap	0.028	
	В среднем	0.056	
Kr3, Kr4	Aat-1	0.163	0.047
	Aat-2	0.041	
	Aat-3	0.008	
	Dia-1	0.089	
	6Pgdh	0.000	
	Mdg-3	0.002	
	Mdh-1	0.000	
	Aap	0.057	
	В среднем	0.067	

Полученные нами данные об отсутствии каких-либо географических или экологических закономерностей в пространственном распределении генетической изменчивости подтверждаются и при анализе таких популяционных признаков, как половая и возрастная структуры популяций.

Выводы. Межпопуляционная подразделенность родиолы ирмельской составила $F_{st} = 0.115$. Географические закономерности в пространственном распределении генетической изменчивости и влияние экологических условий на генетическую структуру популяций выражены слабо. Дифференциация близкорасположенных выборок в целом выражена меньше, чем у популяций из разных горных хребтов.

При отборе генотипов для создания искусственной популяции для интродукции в природные местообитания следует рассмотреть два параметра – число особей на популяцию и число отбираемых популяций. Для этого целесообразно объединять растения из близкорасположенных местообитаний и сходных экологических условий произрастания. При этом существенно возрастает генетическое разнообразие, произойдет оптимизация генетической, половой и возрастной структуры.

Библиографический список

1. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. - М.: Наука, 1991. - 271 с.

2. Мамаев С.А., Семериков Л.Ф., Махнев А.К. О популяционном подходе в лесоводстве // Лесоведение. – 1988. - № 1. – С. 3-9.
3. Мулдашев А.А., Абрамова Л.М., Мартыненко В.Б., Шигапов З.Х., Галеева А.Х., Маслова Н.В. О современном состоянии и восстановлении природных популяций *Rhodiola iremelica* Boriss. На южном урале // Известия Самарского науч.центра РАН, 2010. Т.12. №1 (5). С. 1412-1416.
4. Свиридова Т.П. К изучению биологических особенностей золотого корня при его введении в культуру // Бюлл. Сиб. бот. сада. – Томск, 1978. – С. 50-54.
5. Шиятов, С.Г. Влияние изменения климата на экосистемы / С.Г. Шиятов, В.С. Мазепа, П.А. Моисеев, М.Ю. Братухина. – М., 2001. – С. 16- 31.
6. Gregorius H.R. The attribution of phenotypic variation to genetic or environmental variation in ecological studies // Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Populations / F. Scholz, H.-R. Gregorius, D. Rudin (Eds.). - Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1989. - P. 3-15.
7. Hamrick J. L., Godt M.J.W., Sherman-Broylers S.L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species // New Forest. - 1992. - N 6. - P. 95-124.
8. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. - 1972. - V. 106. – N. 949. - P. 283-292.
9. Ornstein L. Disc electrohoresis. Background and theory// Ann. New York Acad. Sci.- 1964.- V.121.- . 321-349.
10. Swofford D.L., Selander R.B. BIOSYS-1: a FORTRAN programm for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and biosystematics // J. Hered. 1981. Vol. 72. P. 281-283.
11. Wright S. Evolution and genetics of populations. Chikago: Univ. Chikago press, 1969. Vol. 2. 511 P.

УДК: 633.521:577.21

Богданова М.В.

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», г. Минск

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ СОРТОВ ЛЬНА, ВКЛЮЧЕННЫХ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСИ

Ключевые слова: Лен, сорта, микросателлитный анализ, полиморфизм, аллели

Введение. Лен – одна из древнейших и ценных прядильных и масличных культур, волокно которой по прочности превосходит хлопок, джут и шерсть, а льняное масло находит применение в различных областях промышленности.

Льняной агрономический комплекс Беларуси в значительной степени определяет экономическое состояние республики, так как, с одной стороны, является источником сырья для текстильной и других отраслей промышленности, а с другой – обеспечивает значительные валютные поступления за счет экспорта волокна и изделий из него. Традиционно в

Беларуси возделывається лен-долгунец. Однако посевные площади под этой культурой уменьшились, урожайность и качество льнопродукции снизились. Одним из основных путей повышения валового сбора и улучшения качества льнопродукции является выведение и внедрение в производство новых высокопродуктивных, устойчивых к полеганию и болезням сортов льна-долгунца.

Новым этапом в исследовании льна является прямой анализ его генома и связанный с этим поиск молекулярных маркеров, позволяющих проводить дифференциацию, идентификацию и генотипирование различных образцов льна. Генетические исследования сортов льна с использованием молекулярных маркеров помогут селекционерам расширить генетический базис селекционного материала, используемого ими для улучшения сортов льна.

На сегодняшний день для генетической оценки ресурсов льна разработаны различные методики молекулярного маркирования, такие как метод маркирования генетического материала путем амплификации ДНК с произвольными праймерами (RAPD), полиморфизм длин рестриционных фрагментов (RFLP), полиморфизм длин продуктов амплификации (AFLP) и SSR-анализ, основанный на полиморфизме микросателлитных последовательностей [1-7]. Однако применение некоторых типов маркеров (RAPD, RFLP и AFLP) ограничено, поскольку одни из них трудно воспроизводимы (RAPD), получение других (RFLP и AFLP) довольно трудоемко. Кроме того, лен принадлежит к числу видов с низким уровнем генетического полиморфизма. Это является следствием самоопыления и ограниченного числа источников, используемых при создании современных сортов. RAPD маркеры дают возможность достоверно идентифицировать дикие виды [8-10] и сорта масличного льна [11-12], но возникают трудности с идентификацией сортов льна-долгунца.

Метод анализа полиморфизма микросателлитов, позволяющий получать воспроизводимые, информативные профили известных фрагментов генома, является наиболее перспективным для эффективного решения различных задач современной селекции, таких как идентификация, паспортизация и сертификация сортов, поддержание генетических коллекций, составление родословных, защита интеллектуальной собственности, подбор родительских пар при скрещивании.

Цель работы заключалась в изучении генетического полиморфизма сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси с использованием SSR маркеров.

Материалы и методы. Для микросателлитного анализа использовали 36 сортов льна-долгунца и 3 сорта льна масличного, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Беларуси на 2012 год. Подготовку растительного материала и экстракцию ДНК проводили, используя Genomic DNA Purification Kit, #K0512 (Fermentas) по модифицированной методике производителя. Реакционная смесь включала 20нг геномной ДНК, по 0,25мкМ прямого и обратного праймера, 200мкМ

каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, от 1,5 до 2,5мМ MgCl₂ и 1 единицу Taq-полимеразы в инкубационном буфере.

Анализ полиморфизма микросателлитов проводили с использованием ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами [7, 13].

ПЦР проводили в амплификаторе BioRad в следующих условиях: 94°C в течение 5 мин, 25 циклов с параметрами: денатурация при температуре 94°C в течение 30 с, отжиг праймеров в течение 45 с (температура отжига подбирается в зависимости от праймера), элонгация при 72°C в течение 40 с. Конечная элонгация при 72°C 5 мин. Продукты амплификации денатурировали формамидом и разделяли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). Определение размеров аллелей осуществляли при помощи программного обеспечения GeneMapper v4.1. (Applied Biosystem, США), используя стандарт S450 (COrDIS, Россия).

Статистический анализ выполняли с использованием надстройки для электронной таблицы MS Excel – GenAlEx 6.41 [14].

Результаты исследования.

Анализ полиморфизма 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр Беларуси, проводили с использованием 18 пар SSR-праймеров, которые в совокупности амплифицировали 121 аллель размером от 96 до 392 п.н. (Таблица 1). Праймеры Lu15 и Flu21 выявили по два мономорфных локуса.

Средний показатель уровня полиморфизма локуса, рассчитанный для всей исследованной выборки, составил $0,706 \pm 0,022$ на локус.

У исследованных сортов в среднем один локус включал 6,05 аллеля, причем эта величина варьировала от 2 (локус Flu21a) до 10 (локус Lu13).

Частота встречаемости различных аллелей 20 микросателлитных локусов в изученной выборке варьировала от 1,3% до 66,7%. При этом подавляющее большинство аллелей встречалось с частотой менее 50% (Рисунок 1).

Таблица 1 – Оценка полиморфизма SSR локусов у 39 сортов льна включенных в Государственный реестр Беларуси

Локус	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер аллелей (п.н.)	PIС	Ne	% эффект. аллелей	Число редких аллелей
Lu2	(TC) ₁₈	4	208-226	0,667	3,003	75,1	0
Lu4	(GA) ₉	6	163-177	0,768	4,315	71,9	1
Lu13	(AC) ₄ (AG) ₁₈	10	331-392	0,800	5,012	50,1	5
Lu15a	(CAT) ₈	6	106-122	0,750	3,997	66,6	2
Lu15b	(CAT) ₈	6	188-217	0,757	4,122	68,7	2
Lu3	(GT) ₁₁	5	155-172	0,675	3,076	61,5	1
Lu8	(AG) ₂₄	6	195-224	0,631	2,709	45,1	3

Lu21	(GA) ₁₅ A ₄	6	171-228	0,674	3,070	51,2	2
Lu17	(GA) ₂₆	6	274-308	0,674	3,067	51,1	3
Lu23	(CA) ₈ (GA) ₂₂	8	239-261	0,825	5,707	71,3	2
Lu28	(TCT) ₈	5	175-191	0,718	3,550	71,0	1
Flu8	(TTC) ₁₂ TTT(TTC) ₂₂ TTT(TTC) ₇	9	105-200	0,812	5,327	59,2	4
Flu7	(TTC) ₂₁	5	142-154	0,791	4,791	95,8	0
Flu9	(TTC) ₁₇	7	105-156	0,698	3,310	47,3	4
Flu11	(TTC) ₂₁	3	102-110	0,582	2,390	79,7	0
Flu24	(TTC) ₁₃	5	96-145	0,565	2,299	46,0	1
Flu25	(TTC) ₂₂ TTTTT T(TTC) ₇	9	180-230	0,810	5,263	58,5	5
Flu10	(TTC) ₁₀	6	140-162	0,655	2,903	48,4	2
Flu21a	(TTC) ₄ T(TTC) ₁₈	2	101-106	0,444	1,800	90,0	0
Flu21b	(TTC) ₄ T(TTC) ₁₈	7	143-161	0,812	5,327	76,1	1
Итого		121					39
В среднем на локус		6,05		0,706±0,022	3,752±0,262	64,2	1,95

PIC – индекс полиморфизма; Ne – число эффективных аллелей



Рисунок 1 Число и частота встречаемости аллелей 20 SSR локусов в исследуемой выборке 39 сортов

Оценивая полиморфизм SSR локусов у изученных сортов, отдельно учитывали частоту встречаемости (а) уникальных аллелей, которые присутствовали только у одного сорта данной выборки и (б) редких аллелей, частота встречаемости которых не превышала 5%. Суммарно из 121 аллели, выявленной в 20 SSR локусах, 39 были редкими (Рисунок 1). В зависимости от локуса, число редких аллелей варьировало от нуля (локусы Lu2, Flu7, Flu11, Flu21a) до пяти (Lu13, Flu25) (Таблица 1).

В изучаемой выборке сортов льна обнаружено 12 сортов с уникальными аллелями и 28 сортов с редкими аллелями (Таблица 2).

Таблица 2 – Сорта льна с редкими аллелями двенадцати *SSR* локусов

Аллель		Сорт	Аллель		Сорт
Lu4	172	Белинка, Прамень	Lu28	186	Лирина, Ручеек
Lu13	331	Лето, Старт, Лира, Йитка	Flu8	115	Алей, Прамень
	360	Старт, Блакит, Заказ		119	Задор
	368	Бренд		168	Велич, Заказ
	376	Вита		171	Ива, Заказ
	392	Алей, Задор	Flu9	116	Алей
Lu15a	112	Старт, Вита, Лаура		139	Йитка, Susanne, Грот, Белинка
	122	Задор, Вита		152	Велич, Бренд
Lu15b	188	Ласка, Веста, Табор		156	Лирина, Бренд, Е-68
	217	Сюрприз, Алей, Задор	Flu24	145	Велич
Lu3	172	Сюрприз, Задор	Flu25	180	Заказ, Блакит
Lu8	195	Заказ, Ярок		184	Заказ, Блакит
	203	Йитка		190	Ива
	224	Сюрприз		210	Пралеска, Ярок, Левит 1, Нива
Lu21	171	Старт		230	Алей, Вита
	228	Сюрприз, Алей, Задор	Flu10	140	Старт, Ласка
Lu17	283	Бренд, Лирина		154	Заказ
	289	Алей	Flu21b	161	Задор
	308	Старт			
Lu23	258	Алей, Лира			
	261	Сюрприз			

Жирным шрифтом выделены сорта с уникальными аллелями

Следует отметить, что сорта Алей, Велич, Задор, Ива, Старт, Бренд, Вита, Йитка и Сюрприз имели одновременно как редкие, так и уникальные аллели. Максимальное число редких аллелей было зафиксировано у сорта Алей - 8 аллелей. По 7 редких аллелей имели сорта Задор и Заказ, 6 аллелей сорт Старт и 5 – Сюрприз.

Значения уровней наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности находились в пределах 0, 103 – 0,872 (в среднем 0,451) и 0,444 – 0,825 (в среднем 0,706) соответственно. Такие высокие значения гетерозиготности свойственны микросателлитным локусам из-за множественности аллельных вариантов, обусловленных изменчивостью числа повторяющихся мотивов ДНК.

Корреляций между наблюдаемым и ожидаемым уровнем гетерозиготности в отношении локусов микросателлитов не выявлено, однако обнаружено, что в большинстве случаев эффективным инструментом оценки избытка или недостатка гетерозигот является показатель индекса фиксации, используемый в популяционной генетике в качестве критерия достоверности принадлежности группы особей к конкретной популяции.

На гистограмме, представленной на рисунке 2, даны значения наблюдаемого и ожидаемого уровня гетерозиготности, а также индекса фиксации.

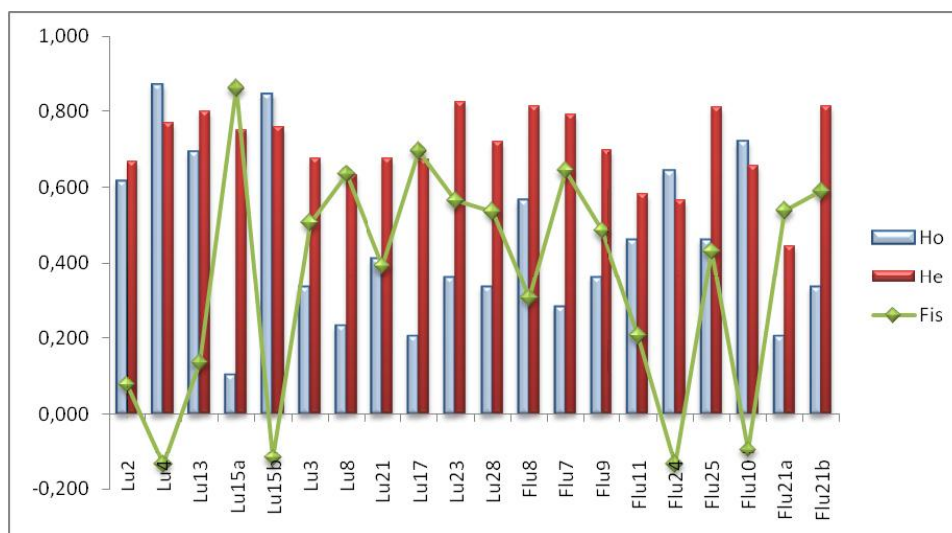


Рисунок 2 Ожидаемая (He) и наблюдаемая (Ho) гетерозиготность и индекс фиксации (Fis) по 20 изученным локусам

Показатель индекса фиксации достаточно точно отражает избыток или недостаток гетерозигот для большинства из изученных локусов - в случае избытка гетерозигот его значение было отрицательным, в противном случае - положительным.

Анализ данных диаграммы показал, что среди 20 изученных локусов только два локуса Lu2 и Lu13 отличаются близким к равновесному по гетерозиготности распределением. Выявлено одиннадцать локусов, отличающихся смещением равновесия в сторону недостатка гетерозигот - это Lu15a, Lu3, Lu8, Lu21, Lu17, Lu23, Lu28, Flu7, Flu9, Flu21a и Flu21b. Наибольший разрыв отмечен для локуса Lu15a (показатель недостатка гетерозигот около 0,863), что объясняется как его естественной гомозиготностью у всех сортов, так и высоким уровнем полиморфизма. Во всех остальных случаях, наблюдалась различная степень преобладания показателей наблюдаемой гетерозиготности над ожидаемой.

Показано, что высокогетерозиготные организмы имеют большую адаптивную способность [15]. Монолокусные SSR маркеры предоставляют возможность оценить уровень гетерозиготности организма. Для того чтобы исследовать возможную связь степени гетерозиготности сортов и их

адаптивности, из общей выборки были отобраны сорта с широкой адаптивностью (допущенные к использованию в нескольких регионах Беларуси) и сорта с узкой адаптивностью.

Для этих двух групп сортов были подсчитаны ожидаемая (H_e), наблюдаемая (H_o) гетерозиготность, а также индекс фиксации. На гистограмме, представленной на рисунке 3, даны значения наблюдаемого и ожидаемого уровня гетерозиготности, а также индекса фиксации для группы узко адаптивных сортов.

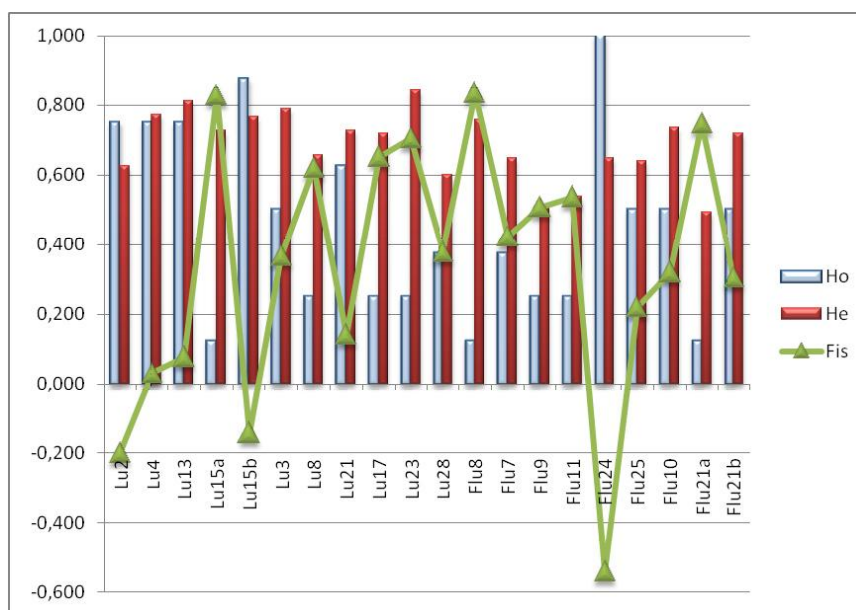


Рисунок 3 Ожидаемая (H_e) и наблюдаемая (H_o) гетерозиготность и индекс фиксации (F_{is}) по 20 изученным локусам у узко адаптивных сортов.

На гистограмме, представленной на рисунке 4, даны значения наблюдаемого и ожидаемого уровня гетерозиготности, а также индекса фиксации для группы широко адаптивных сортов.

Рассчитанные показатели гетерозиготности для 20 SSR локусов были несколько выше в группе широко адаптивных сортов (среднее значение F_{is} – 0,333) по сравнению с узко адаптивными сортами (среднее значение F_{is} – 0,350). Возможно, для более объективной оценки взаимосвязи степени гетерозиготности и адаптивности сортов льна необходимо анализировать данные для гораздо большего числа SSR локусов.

Выводы. Таким образом, при анализе полиморфизма изученных локусов микросателлитов ДНК льна выявлены характерные особенности по всем исследованным показателям. Показан высокий уровень полиморфизма двадцати микросателлитных локусов у 39 сорта льна, включенных в Государственный реестр Республики Беларусь. В зависимости от локуса число аллелей варьировало от 2 до 10, а значения индекса PIC - от 0,444 до 0,825. Наиболее полиморфным оказался локус Lu23, а наименее полиморфным – локус Flu21a. Значения уровней наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности находились в пределах 0,103 – 0,872 (в среднем 0,451) и 0,444 – 0,825 (в

среднем 0,706) соответственно. Выделены сорта льна-долгунца с редкими и уникальными аллелями (Алей, Блакит, Велич, Задор, Ива, Старт и Сюрприз). Выявленные особенности позволяют более эффективно использовать отдельные локусы для различных целей, ориентируясь на отдельные факторы генетико-популяционного анализа.

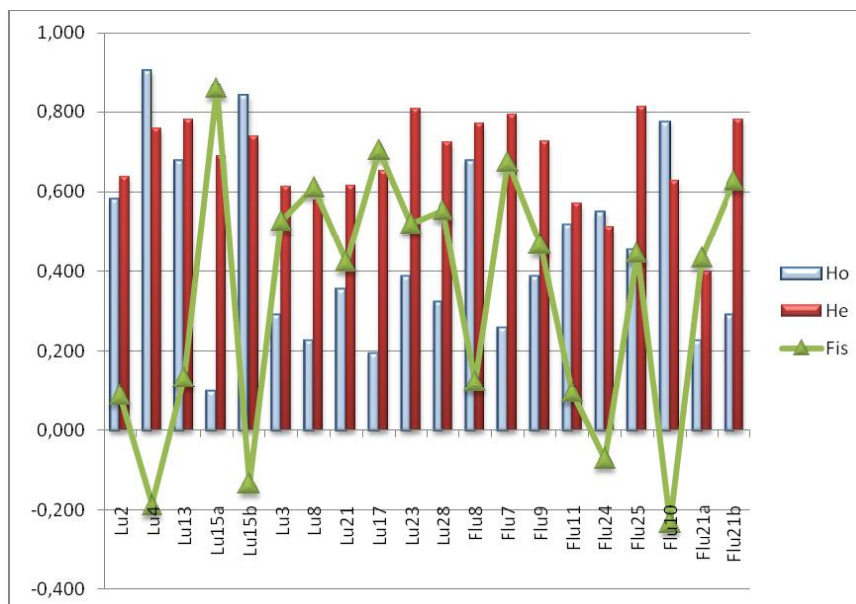


Рисунок 4 Ожидаемая (He) и наблюдаемая (Ho) гетерозиготность и индекс фиксации (Fis) по 20 изученным локусам у широко адаптивных сортов.

Библиографический список

1. Spielmeier W. Identification of quantitative trait loci contributing to Fusarium wilt resistance on an AFLP linkage map of flax (*Linum usitatissimum*) / W. Spielmeier // Theor. Appl. Genet. – 1998. – V. 97. – P. 633-641.
2. Oh T.J. RFLP and RAPD mapping in flax (*Linum usitatissimum*) / T.J. Oh, M. Gorman, C.A. Cullis // Theor. Appl. Genet. – 2000. – V. 101. – P. 590-593.
3. Fu Y.B. RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L. / Y.B. Fu [et al.] // Genet. Resour. Crop. Environ. – 2002. – V. 49. – P. 253-259.
4. Fu Y.B. RAPD analysis of 54 North American flax cultivars / Y.B. Fu [et al.] // Crop Sci. – 2003. – V. 43. – P. 1510-1515.
5. McBreen K. The use of molecular techniques to resolve relationships among traditional weaving cultivars of Phormium / K. McBreen [et al.] // N Zeal. J. Bot. – 2003. – V. 41, N 2. – P. 301-310.
6. Adugna W. The use of morphological and AFLP markers in diversity analysis of linseed / W. Adugna, M.T Labuschagne., C.D. Viljoen // Biodivers Conserv. – 2006. – V. 15 – P. 3193-3205.
7. Roose Amsaleg C. Polymorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum* / C.Roose Amsaleg [et al.]// Mol. Ecol. Notes. – 2006. – V. 6 – P. 796-799.

8. Fu Y.B. Genetic diversity of flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars and landraces as revealed by RAPDs / Y.B. Fu [et al.] // *Genet. Resour. Crop. Environ.* – 2002. – V. 49. – P. 167–174.
9. Лемеш В.А. Генетический полиморфизм рода *Linum* по данным RAPD анализа / В.А. Лемеш [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: научные труды.* – 2005. – Т. 1 – С. 176.
10. Лемеш В.А. RAPD анализ межвидовой генетической изменчивости и филогенетических связей видов льна (род *LINUM* L.) / В.А. Лемеш., М.В. Богданова, Л.В. Хотылева // *Доклады НАН Беларуси.* – 2006. – Т. 50 – С. 51-54.
11. Fu Y.B. Geographic patterns of RAPD variation in cultivated flax / Y.B. Fu // *Plant Genetic Resources.* – 2004. – V. 4 – P. 1084-1091.
12. Гузенко Е.В. ДНК полиморфизм современных сортов льна масличного / Е.В. Гузенко [и др.] // *Материалы VIII съезда Украинского общества генетиков и селекционеров им Н.И. Вавилова «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології».* – Алушта, 2007. – P. 256-260.
13. Deng X. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from flax (*Linum usitatissimum* L.) / X Deng. [et al.] // *African Journal of Biotechnology.* – 2011. – V. 10, N5. – P. 734-739.
14. Peakall R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // *Molecular Ecology Notes.* – 2006. – V. 6. – P. 288-295.
15. Алтухов Ю.П. Монолог о генетике / Ю.П. Алтухов // *Человек.* – 2003. – №. 6. – P. 5-16.

УДК 630*228.7

Братилова Н.П., Шамова С.С.

ФГБОУ ВПО Сибирский государственный технологический университет, г. Красноярск

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ РОСТА ДЕКАПИТИРОВАННОЙ 42-ЛЕТНЕЙ СОСНЫ КЕДРОВОЙ СИБИРСКОЙ В УСЛОВИЯХ КАРАУЛЬНОГО УЧАСТКОВОГО ЛЕСНИЧЕСТВА

Ключевые слова: изменчивость; декапитация; плантационные культуры; сосна кедровая сибирская; интенсивность обрезки; побеги.

Введение. Создание плантационных культур кедровых сосен в условиях ограниченной высоты становится всё более актуальным. Искусственное снижение высоты у семенных деревьев позволит заготавливать семена и черенки без подъема в крону, облегчить работы по гибридизации. Вопросы роста и семеношения кедровых сосен после декапитации верхней части кроны к настоящему времени слабо изучены. Имеются данные И.А. Бежа, В.В. Читоркина (2006) о случаях естественной декапитации сосны кедровой

сибирской в припоселковых кедровниках. Ю.Б. Алексеев (1979) отмечал, что гибель верхушечной почки или осевого побега приводит к образованию многовершинных деревьев, которые в дальнейшем дают в 3-3,5 раза больше урожая семян. И.А. Бех (1989) указывал на ускоренное развитие крон и вступление в репродуктивную фазу деревьев сосны кедровой сибирской в следствие поломки их вершин. Y. Li и др. (1998) выявили, что обрезка верхушки у *Pinus tabulaeformis* способствует лучшему росту ветвей верхних мутовок кроны.

Целью работы явилось установление влияния степени обрезки верхней части ствола и условий освещенности на формирование крон сосны кедровой сибирской спустя 14 лет после декапитации.

Задачи исследования:

1. Установить особенности роста 42-летней сосны кедровой сибирской спустя 14 лет после декапитации верхней части дерева.
2. Провести сравнительный анализ формирования крон 42-летних декапитированных деревьев сосны кедровой сибирской в зависимости от интенсивности обрезки в 28-летнем биологическом возрасте.
3. Выявить влияние условий освещенности на рост и формирование крон деревьев сосны кедровой сибирской спустя 14 лет после декапитации.

Материалы и методы исследования.

Для изучения особенностей роста декапитированной сосны кедровой сибирской у деревьев были измерены основные биометрические показатели (Огиевский, Хиров, 1964; Молчанов, Смирнов, 1967; Родин, Мерзленко, 1983; Чмыр и др., 2000). Объекты исследований представлены плантационными культурами кедровых сосен Учебно-опытного лесхоза СибГТУ Караульного участкового лесничества.

В 1996 г. в плантационных культурах для проведения исследований по формированию низкоштамбовых культур была проведена декапитация крон 28-летней сосны кедровой сибирской, произрастающей под ЛЭП. Для разработки практических рекомендаций по декапитации проводилась обрезка разной степени интенсивности.

При достижении деревьями сосны кедровой сибирской 28-летнего биологического возраста (со средней высотой 5,7 м, диаметром ствола 7,6 м, в у них была проведена обрезка верхней части стволов длиной от 1,6 до 3,7 м, что составило от 4 до 10 мутовок. Средняя высота растений после декапитации была $2,1 \pm 0,05$ м, варьируя от 1,5 до 4,5 м (Щерба, Водин, 2000).

Результаты исследований.

Спустя 14 лет после проведения обрезки крон высота декапитированных деревьев достигла $7,3 \pm 0,27$ м, диаметр ствола – $14,1 \pm 0,49$ см, диаметр кроны - $2,7 \pm 0,15$ м (таблица 1).

Из приведенных данных видно, что за 14 лет после обрезки средняя высота деревьев увеличилась на 5,2 м, диаметр ствола на 6,5 см, среднепериодический прирост лидирующих побегов верхней мутовки, оставшейся после декапитации, составил $0,37 \pm 0,02$ м. При сравнении темпов роста декапитированных и контрольных деревьев выявлено, что лидирующие побеги

верхней мутовки у обрезанных экземпляров сосны кедровой сибирской росли быстрее, чем центральный побег деревьев, не подвергнутых декапитации. Среднепериодический прирост центрального побега за 14 лет составил у контрольных особей $0,29 \pm 0,07$ м (таблица 2), что меньше аналогичного показателя у сравниваемого варианта на 21,6 %.

Таблица 1 – Биометрические показатели декапитированной сосны кедровой 42-летнего возраста

Показатель	M	$\pm m$	V,%	P,%
Высота, м	7,3	0,27	25,9	3,7
Диаметр ствола на 1,3 м, см	14,1	0,49	24,4	3,4
Диаметр кроны, м	2,7	0,15	39,5	5,6
Диаметр на уровне спила, см	9,5	0,41	30,8	4,4
Среднепериодический прирост за 14 лет, м	0,37	0,02	35,3	5,0
Диаметр лидирующих побегов у основания, см	9,9	0,43	31,1	4,4

Таблица 2 – Биометрические показатели 42-летних деревьев сосны кедровой сибирской, не подвергнутых декапитации (контроль)

Показатель	M	$\pm m$	V,%	P,%
Высота дерева, м	9,8	0,17	6,1	1,8
Диаметр ствола, см	14,5	0,51	12,2	3,5
Диаметр кроны, м	5,2	0,05	3,7	1,1
Средний периодический прирост за 14 лет, м	0,29	0,07	6,4	2,4

Таким образом, высота деревьев, не подвергнутых обрезке, к 42-летнему возрасту составила $9,8 \pm 0,17$ м, что на 2,5 м превышает высоту декапитированных в 28-летнем возрасте экземпляров.

После декапитации деревья были сгруппированы по интенсивности обрезки: сильная (высота на уровне спила составила $1,6 \pm 0,07$ м), средняя ($2,1 \pm 0,03$ м), слабая ($2,6 \pm 0,05$ м). Высота деревьев с сильной интенсивностью обрезки была снижена в среднем на 72 %; при средней интенсивности декапитации сосна кедровая сибирская утратила около 63 % высоты; растения, перенесшие минимальную обрезку, были снижены на 37 % своей высоты.

По утверждению А.В. Водина (1999), у деревьев, перенесших обрезку наименьшей интенсивности, восстановление кроны должно происходить быстрее, так как ветви верхней оставшейся мутовки находятся уже в почти вертикальном положении, и чтобы занять лидирующее положение им потребуется гораздо меньше времени в сравнении с вариантами, утратившими большую часть кроны.

Высота деревьев, подвергнутых в 28-летнем возрасте декапитации кроны с максимальной интенсивностью, к 42-летнему возрасту составила $6,4 \pm 0,49$ м.

Таким образом, эта группа растений за 14-летний период приросла в высоту на 4,8 м. У деревьев этого варианта образовалось по 2-3 лидирующих побега, диаметр которых в месте прикрепления к стволу $8,4 \pm 0,85$ см (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели 42-летней сосны кедровой сибирской с высокой интенсивностью обрезки

Показатель	М	$\pm m$	V,%	P,%
Высота, м	6,4	0,49	28,3	7,6
Диаметр ствола на 1,3 м, см	11,9	0,98	28,5	8,2
Диаметр лидирующих побегов у основания, см	8,7	0,83	34,2	9,5
Диаметр кроны, м	2,4	0,20	30,6	8,2
Среднепериодический прирост за 14 лет, м	0,35	0,03	34,0	9,8

Высота деревьев в варианте со средней интенсивностью обрезки к 42-летнему возрасту достигла $7,5 \pm 0,30$ м, диаметр ствола $14,5 \pm 0,67$ см (таблица 4).

Таблица 4 – Показатели сосны кедровой сибирской средней интенсивности обрезки

Показатель	М	$\pm m$	V,%	P,%
Высота, м	7,5	0,30	20,6	4,0
Диаметр ствола на 1,3 м, см	14,5	0,67	23,9	4,6
Диаметр лидирующих побегов у основания, см	10,0	0,56	29,2	5,6
Диаметр кроны, м	2,7	0,23	44,1	8,5
Среднепериодический прирост за 14 лет, м	0,39	0,02	28,1	5,4

Сосна кедровая сибирская, подвергнутая обрезке наименьшей интенсивности, спустя 14 лет после декапитации имела высоту $8,8 \pm 0,34$ м, диаметр ствола $15,6 \pm 0,76$ см (таблица 5).

Таблица 5 – Показатели сосны кедровой сибирской с низкой интенсивностью обрезки

Показатель	М	$\pm m$	V,%	P,%
Высота, м	8,8	0,34	12,1	3,8
Диаметр ствола на 1,3 м, см	15,6	0,76	15,6	4,9
Диаметр лидирующих побегов у основания, см	11,4	0,66	18,3	5,8
Диаметр кроны, м	3,1	0,28	30,6	9,7
Среднепериодический прирост за 14 лет, м	0,47	0,03	16,4	5,8

Сравнение вариантов со средней и низкой степенью декапитации выявило, что деревья, потерявшие меньшую часть кроны при обрезке в 28-летнем возрасте, спустя 14 лет превышают растения, подвергнутые декапитации средней интенсивности по высоте и среднепериодическому приросту лидирующих побегов верхней мутовки. Различия составляют 17,3 и 30,6 % соответственно.

Анализ роста деревьев сосны кедровой сибирской высокой и низкой степени обрезки выявил, что растения, перенесшие минимальную обрезку, спустя 14 лет достоверно превышают деревья сравниваемого варианта по всем исследуемым показателям: высоте, диаметру ствола и кроны, диаметру и среднепериодическому приросту лидирующих побегов.

По нашему мнению, обрезка простимулировала ростовые процессы, что нашло отображение в увеличении среднепериодического прироста боковых побегов на 22,4 %.

По данным А.В. Водина (1999), спустя два года после декапитации крон разной силы лучшими показателями отличались деревья с наименьшим процентом снижения высоты. Данная тенденция сохраняется и через 14 лет после обрезки крон. Различия по высоте у контрольных деревьев и декапитированных составляют от 10,2 до 34,7 %, в зависимости от степени декапитации (рисунок 1).

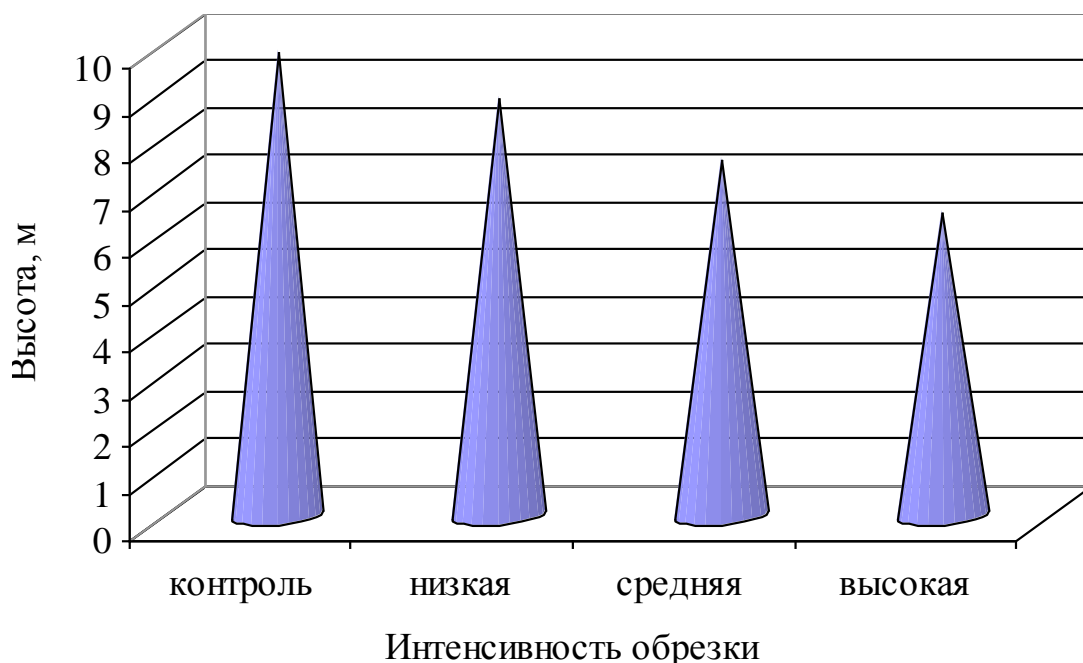


Рисунок 1 – Высота 42-летней декапитированной сосны кедровой сибирской спустя 14 лет после обрезки разной интенсивности и в контроле

В.М. Белобородовым (1979) при исследованиях культур сосны обыкновенной было замечено, что при формировании низкоштамбовых деревьев после обрезки происходит уменьшение диаметра крон за счет

изменения угла прикрепления ветвей к стволу с почти прямого на острый. На изменение углов прикрепления ветвей у сосны кедровой сибирской указывает и А.В. Водин (1999). По его мнению, чем ниже интенсивность обрезки, тем меньше становятся углы в местах прикрепления к стволу боковых побегов.

Спустя 14 лет после проведения декапитации у всех деревьев побеги, расположенные в мутовках ниже верхней, оставленной при обрезке, находятся в угнетенном состоянии. Большого увеличения крон деревьев в ширину не произошло. После удаления вершины наиболее крупные ветви, ближайшие к срезу мутовки (от 1 до 4 шт.), вышли в лидирующие. Они, в основном, занимают преимущественное положение при формировании кроны. Диаметры крон сравниваемых вариантов представлены на рисунке 2.

Интенсивность обрезки

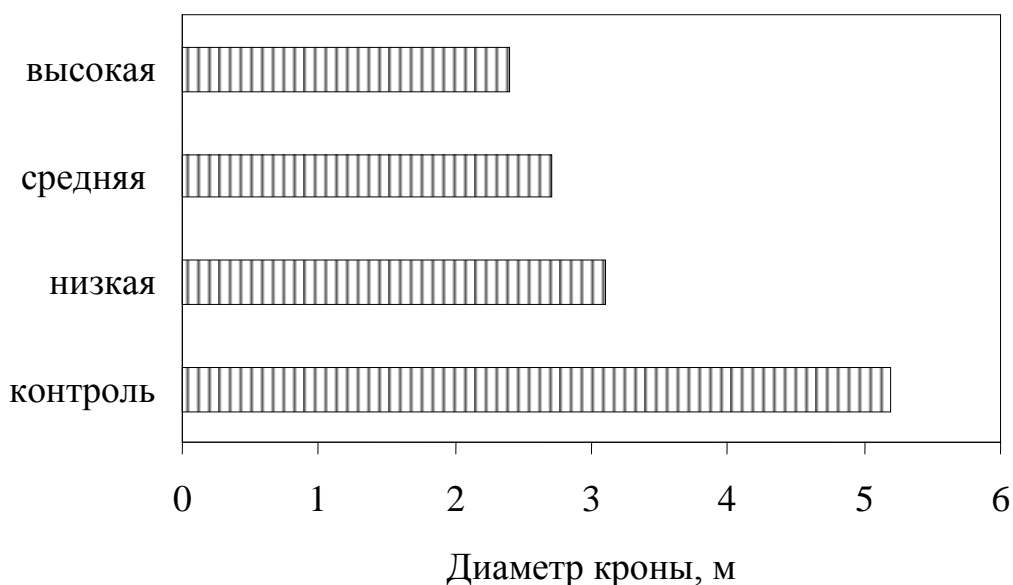


Рисунок 2 – Диаметр крон 42-летних декапитированных и контрольных деревьев сосны кедровой сибирской в культурах

Установлено, что диаметр крон контрольных растений достоверно превышает аналогичный показатель в сравниваемых вариантах, различия по данному показателю с деревьями, перенесшими декапитацию высокой интенсивности, составляют 53,8 %, средней – 48,1 %, низкой – 40,4 %.

Изучено влияние условий произрастания на декапитированные растения сосны кедровой сибирской.

Растения произрастали в неодинаковых условиях – по периметру плантации, с хорошей освещенностью и под пологом необрезанных деревьев. К 42-летнему возрасту высота сосны кедровой сибирской варьировала от $5,9 \pm 0,28$ м у деревьев, растущих под пологом, до $8,7 \pm 0,18$ м у деревьев, выросших в условиях хорошей освещенности. Диаметр ствола изменялся от $12,7 \pm 0,50$ до $16,0 \pm 0,68$ см (таблица 6).

Таблица 6 – Биометрические показатели сосны кедровой сибирской, растущей на открытом месте и под пологом

Показатель	M	±m	V,%	P,%	t_{ϕ} при $t_{05}=2,01$
Высота, м					
На открытом месте	8,7	0,18	10,7	2,1	8,41
Под пологом	5,9	0,28	24,2	4,7	
Диаметр ствола, см					
На открытом месте	16,0	0,68	20,5	4,3	2,79
Под пологом	12,7	0,50	20,2	4,0	
Диаметр кроны, м					
На открытом месте	3,4	0,20	29,5	5,8	9,84
Под пологом	2,1	0,10	23,1	4,5	
Диаметр лидирующих побегов у основания, см					
На открытом месте	11,6	0,36	16,1	3,1	4,69
Под пологом	8,4	0,58	35,1	6,9	
Среднепериодический прирост за 14 лет, м					
На открытом месте	0,48	0,01	10,3	2,0	8,94
Под пологом	0,28	0,02	33,8	7,2	

Выводы:

1. В результате исследований установлено, что кроны декапитированных деревьев формируются в основном, за счет боковых ветвей верхней, оставшейся после обрезки мутовки. Лидирующие побеги у обрезанных экземпляров сосны кедровой сибирской формируют ежегодные приросты большей длины, чем центральный побег деревьев, не подвергнутых декапитации.
2. Большой высотой и диаметром кроны спустя 14 лет после декапитации отличаются деревья, перенесшие обрезку низкой интенсивности до 37% кроны.
3. Декапитированные деревья, произрастающие в условиях лучшей освещенности, отличаются большей высотой, диаметром ствола и кроны, имеют больший диаметр лидирующих побегов у основания, а также сформировали среднепериодические приросты за 14 лет большей величины.

Библиографический список

1. Алексеев, Ю.Б. Семенная продуктивность многовершинных и многоствольных деревьев кедра сибирского / Ю.Б. Алексеев // Селекционные основы повышения продуктивности лесов. – Воронеж, 1979. – С. 68-70.

2. Белобородов, В.М. Цели и возможности обрезки деревьев сосны на семенных плантациях / В.М. Белобородов // Селекционные основы повышения продуктивности лесов. – Воронеж, 1979. – С. 59-64.
3. Бех, И.А. Поломка и смена вершин у молодых деревьев кедра сибирского / И. А. Бех // Проблемы кедра. Организация комплексного хозяйства. – Томск: ГалаПресс, 1989. – С. 63-69.
4. Бех, И.А. Рекомендации по формированию припоселковых кедровников/ И. А. Бех, В.В. Читоркин. – Томск: ГалаПресс, 2006. – 35 с.
5. Водин, А.В. Формирование плантационных культур кедра сибирского путем обрезки верхней части кроны / А.В. Водин // Проблемы химико-лесного комплекса. – Красноярск: СибГТУ, 1999. – С. 26.
6. Щерба, Н.П. Влияние качества посадочного материала, агротехники выращивания и декапитации крон на рост и формирование фитомассы кедра сибирского / Н.П. Щерба, А.В. Водин. - Красноярск: СибГТУ, 2000. - 84 с.
7. Li, Y. Результаты проведения искусственного отбора и обрезки в семенных питомниках *Pinus tabulaeformis* / Y. Li, H. Li, X. Shen // *Bijing liye daxuebao*. – Beijing: Beijing Forest University, 1998. – № 1. – С. 7–13.

УДК 630*17: 582.632.1 (470.57)

Байрамгулова З.Х., Редькина Н.Н., Байрамгулов Н.Р.

ФГБОУ ВПО БашГУ, г. Уфа,

Зауральский филиал Башкирский ГАУ, г. Сибай

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОФОНДА СОЛОДКИ КОРЖИНСКОГО НА ЮГО-ВОСТОКЕ БАШКОРТОСТАНА

Ключевые слова: солодка Коржинского; биоразнообразие, популяционная структура.

Цель исследования – изучение популяционной структуры лекарственного растения *G. korshinskyi* в Башкирском Зауралье с применением изоферментных генетических маркеров. Для этого были определены генотипы растений 20 местообитаний в Хайбуллинском и Баймакском административных районах Башкортостана, а также прилегающих территориях Оренбургской области. В целом у солодки Коржинского уровень аллозимного разнообразия оказался сравнительно высоким, по сравнению с другими видами эндемичных растений. На основе полученных результатов разработаны подходы, направленные на сохранение популяционного разнообразия в природных местообитаниях и рациональное использование генетических ресурсов растения в условиях *ex situ*.

Сохранение биологического разнообразия на Земле является в последние десятилетия одной из глобальных проблем человечества. Эндемичные виды

особо уязвимы в условиях усиления антропогенной трансформации природных экосистем (Hamrick et al., 1992). Для их сохранения важно предотвратить уменьшение популяционного разнообразия, которое определяет потенциал для адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды (Gregorius, 1989). Поэтому исследование популяционной структуры эндемичных видов растений актуально как с теоретической, так и с практической точки зрения.

Солодка Коржинского *Glycyrrhiza korshinskyi* Grig. (*Fabaceae*), эндемик Южного Урала, находящийся под охраной государства (Красная книга Республики Башкортостан ..., 2001), является информативным объектом для экспериментального исследования и теоретического обобщения проблем сохранения эндемичных видов растений. В пределах ареала на территории Республики Башкортостан вид представлен во фрагментированных местообитаниях, в разной степени нарушенных при сельскохозяйственном и промышленном освоении степных экосистем. К настоящему времени детально изучены ресурсы растения, его адаптивная стратегия, синтаксономия, эколого-фитоценологические, морфофизиологические и фитохимические показатели (Муртазина и др., 2002). Однако его биологическое разнообразие на популяционном уровне, наиболее перспективном для решения проблем охраны видов эндемичных растений (Hamrick, 1991), до сих пор оставалась практически неисследованным.

Цель исследований – изучение популяционной структуры *G. korshinskyi* в Башкирском Зауралье с применением изоферментных генетических маркеров.

Выбор мест для закладки пробных площадей определен тем, чтобы были представлены разные экологические условия местообитания (степные, лугово-степные и «придорожные», возникшие сравнительно недавно при антропогенной трансформации степей), популяции с разной численностью особей и с различной степенью их деградации вследствие из-за антропогенных факторов. Всего в Хайбуллинском и Баймакском административных районах, а также прилегающих территориях Оренбургской области были заложены 20 пробных площадей.

Для экстракции ферментов использован экстрагирующий буфер: 0.1 М трис-НСl, рН 8.0, содержащий 17 % сахарозы, 0.1 % 2-меркаптоэтанола, 0.05 % диэтилдитиокарбоната натрия. Навеску свежесобранных листьев в 200 мг растирали в фарфоровой ступке с добавлением 1 мл охлажденного экстрагирующего буфера. При исследовании изоферментов проростков объем экстрагирующего буфера пропорционально уменьшался. Для связывания полифенолов перед гомогенизацией добавляли около 200 мг нерастворимого поливинилпирролидона Polyclar AT. Далее гомогенат центрифугировали в течение 20 минут при 15-17 тыс. об/мин в холодильнике. Разделение изоферментов проводили методом диск-электрофореза в вертикальных пластинах 7.5 %-ного полиакриламидного геля с рН разделяющего геля 8.9 (Davis, 1964; Ornstein, 1964) с применением трис-глицинового электродного буфера с рН 8.3. Гистохимическое выявление зон ферментативной активности после электрофореза проводили по стандартным методикам (Корочкин и др., 1977) с некоторыми нашими модификациями.

При изучении структуры популяций в качестве маркеров использовали изоферменты семи полиморфных локусов - Dia-1, Dia-2, Sod-1, Gdh-1, Fdh-1, Mdh-2 и Lap-2, контролирующих синтез ферментов диафоразы (DIA, 1.6.4.3), супероксиддисмутазы (SOD, кодовый номер 1.15.1.1.), глутамат-дегидрогеназы (GDH, 1.4.1.2), формиатдегидрогеназы (FDH, 1.2.1.2), малатдегидрогеназы ((MDH, 1.1.1.37)) и лейцинаминопептидазы (LAP, 3.4.11.1). Для обозначения ферментов нами использована одна из общепринятых номенклатур (Prakash et al., 1969).

При анализе уровня популяционной изменчивости использовались стандартные параметры, наиболее часто встречающиеся в популяционных исследованиях с применением молекулярных маркеров: частота аллелей и генотипов, ожидаемая (H_E) и наблюдаемая (H_o) гетерозиготность, индекс фиксации Райта F (коэффициент инбридинга), число генотипов, среднее число аллелей на локус A и доля полиморфных локусов P (в том числе с введением критериев полиморфности). Эти параметры, расстояние Нея D , а также показатели F -статистики Райта F_{IS} , F_{IT} и F_{ST} (Wright, 1969) вычисляли с использованием компьютерной программы BIOSYS-1. Для определения многолокусных генотипов (сортирования особей, обладающих одними и теми же аллелими по всем использованным локусам) при выявлении клонового состава выборок применена программа GSED.

Установлено, что для изучения генетической подразделенности и разнообразия популяций *G. korshinskyi* у диафоразы было возможным использование локусов Dia-1 и Dia-2, в которых обнаружены 3 и 4 аллеля, соответственно. У супероксиддисмутазы доступной для анализа оказалась изменчивость одного локуса – Sod-1 с тремя аллелими. Единственная зона глутаматдегидрогеназы контролируется локусом Gdh-1, мономорфного или слабополиморфного в большинстве популяций (всего обнаружены 3 аллеля). У формиатдегидрогеназы описана изменчивость одного локуса Fdh-1, обладающего тремя аллелими. Лейцинаминопептидаза в гелях обнаруживается в виде двух изменчивых зон. Локус Lap-2, использованный для популяционного анализа, имеет три аллеля. Два электрофоретических варианта выявлены в локусе Mdh-2.

Между популяциями выявлены сравнительно большие различия параметров популяционного разнообразия (табл.). В некоторых местообитаниях полиморфными являются все использованные локусы, в других – большинство из них мономорфны. Это обусловлено в основном разной величиной и числом клонов в местообитаниях, как показал учет уникальных (не повторяющихся в одной выборке) многолокусных генотипов материнских растений. Из 82 многолокусных генотипов, обнаруженных в генеральной совокупности особей, 47 (57.3%) являются уникальными – встречаются лишь один раз. Двумя похожими «генетическими портретами» обладают 17 многолокусных генотипов (20.7%), тремя – 7 (8.5%). Лишь 13.5% уникальных генотипов встречаются в популяциях 4 и более раз. Это является доказательством большого влияния вегетативного размножения растения на популяционную

структуру *G. Korshinskyi*, а не недостаточной разрешающей способности метода электрофореза изоферментов и/или ограниченности набора использованных полиморфных локусов.

Величина генотипического (клонового) разнообразия значительно меняется от популяции к популяции. Исследованные особи некоторых местообитаний по отдельным локусам были представлены преимущественно гетерозиготами.

Таблица Параметры популяционного разнообразия выборок *G. korshinskyi*

Выборки	<i>A</i>	<i>P</i>	H_E	H_O
1	1.9±0.1	85.7	0.241±0.064	0.257±0.065
2	1.9±0.1	85.7	0.236±0.070	0.214±0.054
3	1.7±0.2	71.4	0.262±0.079	0.247±0.073
4	1.7±0.2	71.4	0.268±0.080	0.321±0.099
5	1.6±0.2	57.1	0.189±0.079	0.250±0.134
6	1.7±0.3	57.1	0.191±0.069	0.190±0.079
7	1.7±0.3	57.1	0.228±0.083	0.208±0.095
8	1.4±0.2	42.9	0.185±0.088	0.127±0.070
9	1.7±0.3	57.1	0.160±0.077	0.161±0.076
10	1.1±0.1	14.3	0.071±0.071	0.071±0.071
11	2.0±0.2	85.7	0.276±0.065	0.286±0.061
12	1.9±0.1	85.7	0.262±0.069	0.234±0.059
13	1.4±0.2	42.9	0.175±0.085	0.196±0.094
14	1.7±0.3	57.1	0.194±0.087	0.190±0.083
15	1.6±0.2	57.1	0.243±0.088	0.220±0.081
16	1.7±0.2	71.4	0.204±0.074	0.161±0.059
17	1.9±0.3	71.4	0.275±0.081	0.276±0.084
18	2.0±0.0	100.0	0.242±0.049	0.214±0.054

Влияние клоновой структуры на параметры популяций обусловило то, что связь генетических и географических расстояний не выявляется – популяционная структура *G. korshinskyi* в Башкирском Зауралье построена по типу «мозаики». По этим же причинам, видимо, выявлена сравнительно не высокая для эндемичных видов растений межпопуляционная подразделенность – для выборок материнских растений - $F_{ST}=0.151$ (по локусам меняется от 0,046 до 0,201).

В целом у *G. korshinskyi* уровень аллозимного разнообразия оказался довольно высоким, по сравнению с другими видами эндемичных видов растений. По использованным восьми полиморфным локусам выявлены следующие уровни популяционного разнообразия – среднее число аллелей на локус $1.7±0.1$ (изменения в пределах 1.1-2.0, коэффициент вариации 13.5 %), доля полиморфных локусов в средней выборке $65.1±4.8$ % (14.3-100.0 %, 31.2 %), средняя ожидаемая гетерозиготность $0.217±0.012$ (0.071-0.276, 23.8 %),

средняя наблюдаемая гетерозиготность 0.212 ± 0.014 (0.071-0.321, 28 %). В целом на уровне вида влияние инбридинга практически не выражено (индекс фиксации Райта $F = +0.023$).

На основе полученных результатов разработаны подходы, направленные на сохранение популяционного разнообразия в природных местообитаниях и рациональное использование генетических ресурсов растения в условиях *ex situ*.

Относительно высокое (учитывая статус эндемика у *G. korshinskyi*) популяционное разнообразие и сравнительно низкая межпопуляционная подразделенность, возможно, обусловлено тем, что сокращение численности и объемов популяций и фрагментация местообитаний вида могли произойти лишь в исторически недавнее время, главным образом, в ходе сельскохозяйственного освоения (распашки) степей. При этом число сменившихся поколений может быть недостаточно большим, чтобы снижение эффективной численности популяций оказало влияние на их разнообразие. Доказательством этого предположения является сбалансированность состава генотипов – статистически достоверное расхождение ожидаемых и наблюдаемых распределений генотипов выявлено лишь в одной выборке на уровне $P = 0.021$ – 0.8 % от 126 теоретически возможных случаев нарушения правила Харди-Вайнберга.

Еще одним фактором (не противоречащим первой гипотезе), обусловившим выявленные закономерности формирования популяционных структур является сравнительно большая, по сравнению со многими другими эндемичными видами, величина ареала *G. korshinskyi* – вид обитает в полупустынной и степной зонах в междуречье рек Волги и Урала, а также в Западном Казахстане. Эта обширная территория занята большим числом популяций, многие из которых обладают сравнительно большими объемами и численностью особей.

Многие биоэкологические свойства *G. korshinskyi* способствуют сравнительно высокому популяционному разнообразию и низкой дифференциации ее популяций. Среди них в первую очередь нужно упомянуть перекрестное опыление растения, высокая морфологическая изменчивость особей в популяциях, существование, дополнительно к семенному возобновлению, вегетативного размножения, дающее возможность консервации (наряду с избирательной способностью прорастания семян в различных условиях и в течение длительного времени) имеющегося в прошлом разнообразия генофонда. Кроме того, возможна гибридизация с близкими видами в зонах перекрытия ареалов, способствующая повышению внутривидового разнообразия (Беляев, Васфилова, 2004). *G. korshinskyi* способна, как показал проведенный анализ научной литературы, обитать в разнообразных экологических условиях и относительно устойчива к экстремальным факторам среды степей и полупустынь. Последнее доказывается наблюдающейся сравнительно быстрой колонизацией

антропогенно измененных ландшафтов. При этом не наблюдается действие эффектов «основателя» и «бутылочного горла», дрейфа генов, а производные популяции обладают, как показано нами, относительно высоким уровнем аллозимного разнообразия.

Учитывая полученные данные о сравнительно высоком популяционном разнообразии, низком уровне пространственной подразделенности генофонда, приведенные выше аргументы о возможных причинах этих закономерностей, можно сделать заключение о том, что *G. korshinskyi* в пределах Башкирского Зауралья не требует принятия срочных мер охраны ее биоразнообразия на популяционном уровне. Достаточными могут быть выделение эталонных участков и популяций с наиболее высоким разнообразием генофонда в качестве малых ООПТ, а также охрана растения в других формах в имеющихся основных природных местообитаниях. Можно также рекомендовать изменение категории статуса редкости с 2 на 3. Это позволит уделять больше внимания редким и исчезающим видам растений, более нуждающимся во в охране.

При введении в растения в культуру в качестве базовых объектов необходимо использовать популяции с наибольшим генотипическим (клоновым) разнообразием. Это, кроме представленности в условиях *ex situ* достаточно большей части генофонда вида и его охраны вне природных условий, обеспечит широкие базы для проведения селекционных работ и использования *G. korshinskyi* в качестве нового источника производства лекарственных препаратов.

Библиографический список

1. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. - М.: Наука, 1977. – 275 с.
2. Муртазина Ф. К., Баширова Р. М., Янтурин С. И. и др. Род солодка - *Glycyrrhiza* на Южном Урале: Монография. Уфа: РИО БашГУ. - 2002. - 104 с.
3. Davis B. J. Disc electrophoresis. 11. Methods and application to human serum proteins // Ann. New York Acad. Sci. - 1964. - V. 121. - P. 404 - 427.
4. Gregorius H. R. The attribution of phenotypic variation to genetic or environmental variation in ecological studies // Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Populations / F. Scholz, H.-R. Gregorius, D. Rudin (Eds.). - Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1989. - P. 3 - 15.
5. Hamrick J. L., Godt M. J. W. Allozyme diversity in plant species // Plant population genetics, breeding, and genetic resources. (Brown H. D., Clegg M. T., Kahler A. L., Weir B. S. eds.) - 1989. - P. 43 - 63.
6. Ornstein L. Disc-electrophoresis. I. Background and theory // Ann. New York Acad. Sci. - 1964. - V. 121. - P. 321 - 349.
7. Wright S. Evolution and genetics of populations // Chicago: Univ. Chicago press, 1969. - V. 2. - 511 p.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТИМУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НИЗКОЧАСТОТНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА АПИКАЛЬНЫЕ КОРНЕВЫЕ МЕРИСТЕМЫ ЧЕЧЕВИЦЫ *LENS CULINARIS* MEDIC.

Ключевые слова: чечевица; апикальные корневые меристемы; магнитобиология; магнитное поле; стимулирующее действие

Введение. Электромагнитные поля (ЭМП) представляют собой важный экологический фактор, воздействующий на живые организмы на протяжении всей их эволюции, с момента появления до настоящего времени. Живые организмы приспособлены к определенному уровню геомагнитного поля. Вмешательство человека в электромагнитную среду обитания привело к ее значительным изменениям. Многочисленные исследования свидетельствуют о значимости таких изменений природного электромагнитного фона по отношению к различным группам живых организмов и выявляют разнообразные биологические эффекты искусственных ЭМП на разных уровнях организации живых систем [1]. При этом большинство проведенных исследований не являются целостными, поскольку посвящены влиянию с определенными параметрами на отдельные признаки различных биообъектов. Общими чертами публикаций по данной тематике являются разнообразие, неоднозначность, иногда даже противоречивость полученных данных и отсутствие какого-либо обоснования в выборе физических параметров исследуемых ЭМП. Сложность обобщения весьма разнородных данных приводит к тому, что полной картины, проясняющей детали биологического действия ЭМП, не складывается не только в отдельных исследованиях, но и в их сумме, что по-прежнему не позволяет заложить теоретический фундамент магнитобиологии как науки, изучающей биологические эффекты ЭМП. Сложность построения теории также обусловлена плохой воспроизводимостью результатов магнитобиологических экспериментов [2].

Несмотря на недостаточную изученность биологического действия ЭМП, наряду с промышленным использованием, искусственные ЭМП успешно применяются в медицине [3]. При этом фактически получается, что широкое применение ЭМП значительно опережает изучение непосредственных и отдаленных последствий их действия на живые организмы, включая человека.

В связи с этим, изучение биологических эффектов ЭМП представляется достаточно актуальным. Особое внимание заслуживает изучение цитогенетических эффектов ЭМП, в частности, их действие на митоз как на один из важнейших и фундаментальных процессов, происходящих в живых организмах различного систематического положения. Митотическое деление клеток является основой их пролиферации. Пролиферативные процессы в

тканях растений в значительной степени определяют морфологические признаки растений и их физиологические характеристики, проявляющиеся в темпах развития и урожайности.

В отдельных работах отмечается стимулирующее и ингибирующее действие ЭМП с различными параметрами на митотическую активность (МА) растительных клеток. При действии постоянного магнитного поля (МП) с напряженностью 12 кэ на МА апикальных меристем корней бобов обнаружено ее понижение примерно в 2 раза [4]. Установлено повышение МА в корнях ряда растений в неоднородном (60 э) и однородном (20 э) МП низкой напряженности [5]. Отмечена стимуляция МА меристем лука при ослаблении ГМП в 1 млн. раз [6]. Такое же разнообразие результатов отмечается и в исследованиях действия МП на рост и развитие растений [1,7]. Важность выявления условий для достижения магнитобиологических эффектов определенной направленности приводит к необходимости проведения более целостных исследований влияния МП на пролиферацию клеток, рост и развитие растений.

В наших исследованиях были отмечены воспроизводимые эффекты стимуляции МА апикальных корневых и стеблевых меристем представителей восьми семейств, семнадцати родов и видов, 56 различных сортов и линий однодольных и двудольных растений под действием низкочастотного МП с определенными физическими характеристиками [8]. Применялись параметры МП, приводящие к наиболее значительному изменению диэлектрических и акустических свойств водной среды, которое коррелировало с изменениями некоторых свойств химических и биологических систем [9]. Было показано, что переменное МП с частотами из интервала 1-12 Гц и индукцией 25 мТл оказывает стимулирующее действие на МА корневых и стеблевых апикальных меристем растений, принадлежащих к разным классам, порядкам, семействам, родам, видам, сортам и линиям и имеющим внутривидовые различия на уровне ядра и цитоплазмы. При этом величина стимулирующего эффекта может быть разной (иногда свыше 50%) в зависимости от генетических различий, параметров МП и условий воздействия. Стимуляция МА наблюдается при воздействии МП на покоящиеся, прорастающие семена и проростки. Для проявления стимулирующего эффекта (СЭ) необходимы определенные интервал частот и продолжительность воздействия, а также своевременное проращивание семян после экспозиции.

Кроме того, было показано, что величина СЭ подвержена влиянию различных модифицирующих факторов и может количественно варьировать в зависимости от параметров МП, условий воздействия и особенностей исследуемого объекта. Важнейшим биотропным параметром МП является его частота, варьирование которой может приводить к весьма существенным изменениям в величине биологического эффекта. В связи с этим, дальнейшее изучение закономерностей изменения величины СЭ под влиянием различных условий экспериментального воздействия МП на биообъекты представляет собой перспективное направление исследований. Это направление должно

привести в итоге не только к выработке практических рекомендаций для наиболее эффективного воздействия МП на биобъекты, но и к пониманию механизмов их биологического действия, а также возможности прогнозирования направленности и уровня реакции живых систем.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось исследование влияния низкочастотного МП на МА апикальных корневых меристем проростков чечевицы Надежда при воздействии на различных частотах из диапазона от 2 до 20 Гц. При этом решались следующие задачи.

1. Исследование характера изменений МА апикальных корневых меристем проростков чечевицы Надежда при предварительном воздействии низкочастотного МП на семена.

2. Сравнение эффектов воздействия низкочастотного МП на различных частотах из диапазона от 2 до 20 Гц.

3. Изучение влияния низкочастотного МП на относительную продолжительность (ОП) различных стадий митоза.

Материалы и методы исследования. В качестве модельного объекта для исследования действия МП на МА растительных тканей использовались апикальные меристемы корней проростков чечевицы Надежда. Выбор апикальных корневых меристем связан не только с доступностью и простотой их исследования, но и с возможностью анализа достаточно большого количества клеток, которое требуется для получения объективных, статистически обоснованных представлений о характере изменений под действием поля.

Источником переменного МП с частотами от 2 до 20 Гц служил вращающийся диск диаметром 25 см, на котором радиально были прикреплены чередующиеся по полярности постоянные магниты с осью намагничивания, перпендикулярной плоскости диска. Диск, находящийся под чашкой Петри с семенами, вращался с помощью электродвигателя с фиксированной скоростью, обеспечивающей наличие в любой точке рабочей камеры переменного МП заданной частоты [9]. Амплитуда МП внутри камеры вблизи ее дна составляла 25 мТл.

Действию МП подвергались сухие семена. Продолжительность экспозиции семян в МП составляла 1 час. Семена опытных и контрольных растений замачивались в воде в течение 18 часов и проращивались в чашках Петри или кюветах на влажной фильтровальной бумаге. Для цитологического анализа фиксировались кончики корешков, достигших длины 1-1,5 см, через двое суток с момента начала проращивания. Подсчет клеток на разных стадиях клеточного цикла осуществлялся на временных давленных ацетокарминовых препаратах. При анализе использовался световой микроскоп Primo Star фирмы Carl Zeiss. Препараты анализировались при 400-кратном увеличении. Подсчет клеток на различных стадиях клеточного цикла осуществлялся в разных полях зрения на тех участках, где клетки лежали в один слой.

Во всех вариантах каждой повторности было проанализировано не менее 3 тысяч клеток и определены митотический индекс (МИ) – доля делящихся клеток и относительная продолжительность (ОП) каждой фазы митоза – доля клеток на данной стадии деления к общему количеству делящихся клеток.

Для каждого среднего значения МИ производился расчет доверительных интервалов с помощью t-критерия при уровне значимости $p=0,05$ с применением программы STATISTICA 6.0. Для сопоставления МИ в опытных и контрольных вариантах с помощью указанной программы использовался t-тест (независимый, по переменным).

Сравнение средних значений СЭ и ОП проводилось по критерию Фишера, а также графическим методом путем построения доверительных интервалов (с применением t-критерия при уровне значимости 0,05) и сравнения их взаимного расположения [10]. Доверительные границы определялись на основе расчетов ошибки средней арифметической применительно к качественной вариации (при этом нахождение клетки на определенной стадии клеточного цикла рассматривается как качественный признак).

Результаты исследования. В ходе работы у опытных и контрольных растений определялась МА апикальных корневых меристем в виде показателя МИ. Сравнение значений МИ во всех сериях экспериментов показывает, что данный показатель для всех вариантов опыта превышает таковой в контроле (рис. 1). При этом максимальное среднее значение МИ было отмечено в варианте 20 Гц, следующими по величине МИ являются варианты 12, 18, 16 и 2 Гц. Минимальное среди опытных вариантов значение зарегистрировано при частоте МП 10 Гц.

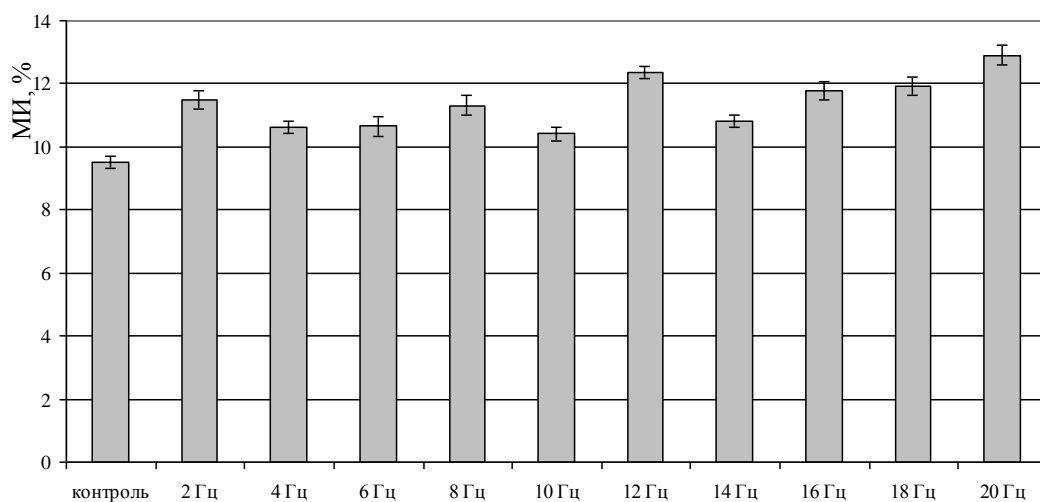


Рис. 1. МА меристем чечевицы Надежда в контроле и при воздействии низкочастотного МП

Анализ данных с помощью программы STATISTICA 6.0 по t-тесту свидетельствует о наличии достоверных различий между контролем и всеми опытными вариантами ($p=0,000000$). Достоверными являются различия между вариантами 2 Гц и 4, 6, 10, 12, 14, 18, 20 Гц ($p \leq 0,036141$), вариантами 4 Гц и 8,

12, 16, 18, 20 Гц ($p \leq 0,001720$), вариантами 6 Гц и 8, 10, 16, 18, 20 Гц ($p \leq 0,002982$), вариантами 8 Гц и 10, 12, 14, 18, 20 Гц ($p \leq 0,018694$), вариантами 10 Гц и 12, 14, 16, 18, 20 Гц ($p \leq 0,008654$), вариантами 12 Гц и 14, 16, 18, 20 Гц ($p \leq 0,030101$), вариантами 14 Гц и 16, 18, 20 Гц ($p \leq 0,000008$), вариантами 20 Гц и 16, 18 Гц ($p \leq 0,000003$). Различия недостоверны между вариантами 2 Гц и 8, 16 Гц, вариантами 4 Гц и 6, 10, 14 Гц, вариантами 6 Гц и 12, 14 Гц, вариантами 16 Гц и 8, 18 Гц.

Полученные данные по стимулирующему характеру действия МП на МА меристем удобно выражать с помощью относительного показателя СЭ, под которым понимается превышение МИ у опытных растений по сравнению с контролем. В проведенных экспериментах отмечены значения СЭ от 9 до 36% (рис 2.). При этом минимальное значение отмечено при частоте 10 Гц, максимальное – при 20 Гц. Относительно высокие показатели (19-25%) были отмечены при частотах МП 2, 8, 12, 16 и 18 Гц.

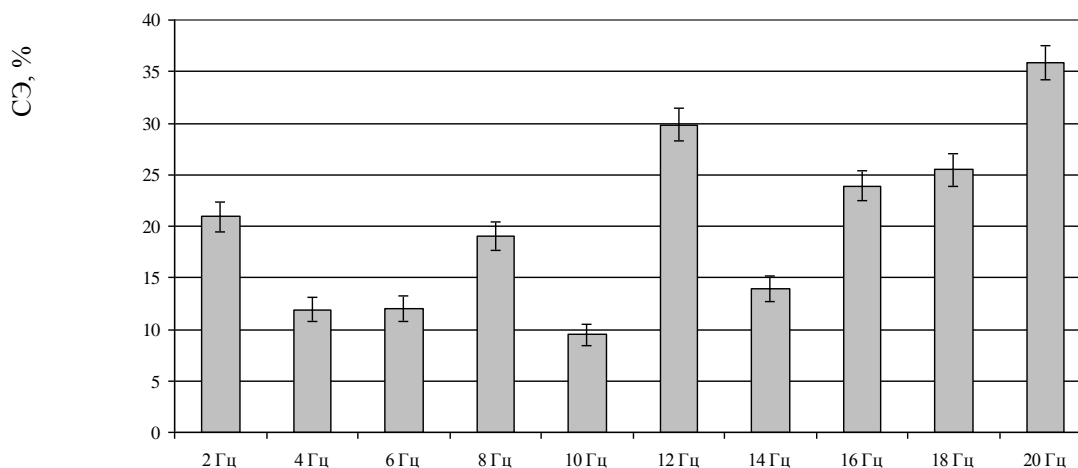


Рис.2. Уровни стимуляции МА меристем чечевицы Надежда при воздействии низкочастотного МП

Оценка достоверности различий между разными вариантами данной серии экспериментов с использованием критерия Фишера показывает наличие значимых различий между вариантом 10 Гц и вариантами 2 и 8 Гц ($p \leq 0,05$), 16 и 18 Гц ($p \leq 0,01$), а также 12 и 20 Гц ($p \leq 0,001$).

Таким образом, в проведенных экспериментах подтверждается существование зависимости величины биологического эффекта от частоты воздействия. Полученные результаты дают возможность разработки практических рекомендаций по воздействию МП на растения с целью достижения СЭ.

Изменение соотношения ОП различных стадий митоза показано на рисунке 3. В исследуемых меристемах отмечается преобладание клеток на стадии профазы, при этом на их долю приходится около 40-50% делящихся клеток. С увеличением частоты МП ОП профаз постепенно уменьшается.

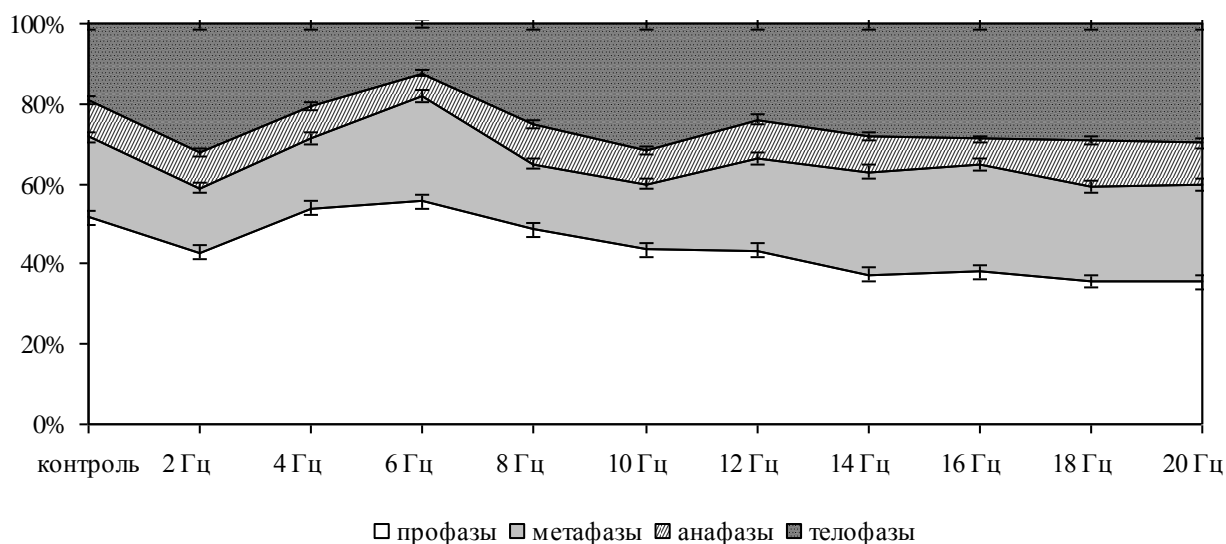


Рис. 3. Соотношение ОП фаз митоза в меристемах чечевицы Надежда в контроле и при воздействии низкочастотного МП

Изменения ОП фаз митоза в опыте по сравнению с контролем могут происходить как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения. Графический метод сравнения средних значений ОП фаз митоза свидетельствует в пользу достоверности следующих изменений этих показателей в опытных вариантах по сравнению с контролем: уменьшение ОП профаз при 2, 10, 12, 14, 16, 18, 20 Гц, уменьшение ОП метафаз при 2, 8, 10 Гц, увеличение ОП метафаз при 6, 12, 14, 16, 18, 20 Гц, уменьшение ОП анафаз при 6, 16 Гц, увеличение ОП анафаз при 18 Гц, увеличение ОП телофаз при 2, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 Гц и уменьшение ОП телофаз при 6 Гц.

Оценка достоверности различий между ОП опытных и контрольных вариантов с использованием критерия Фишера выявляет достоверное уменьшение ОП профаз при 14, 16, 18, 20 Гц, а также достоверное увеличение ОП телофаз при 2 и 10 Гц ($p \leq 0,05$).

Таким образом, можно сделать вывод о разнонаправленном характере изменений ОП различных стадий митоза при воздействии МП с частотами из диапазона от 2 до 20 Гц. Результаты проведенных экспериментов позволяют говорить о возможном влиянии МП на соотношение фаз митоза, однако при этом обозначить какие-либо четкие тенденции изменений ОП различных стадий митоза, не представляется возможным. Это может быть связано как со сложным механизмом действия МП на митотическое деление клеток, так и с действием случайных факторов, затрудняющих выявление каких-либо закономерностей. При этом наличие воспроизводимых эффектов стимуляции МА меристем опытных растений подтверждает существование специального механизма, определяющего влияние МП на митотическое деление клеток.

Активацию меристем на ранних стадиях развития проростка можно рассматривать как одну из возможных причин проявления стимуляции на поздних стадиях онтогенеза (например, повышение общей урожайности). Все это представляет интерес как общебиологическая фундаментальная проблема.

Хорошая воспроизводимость результатов экспериментов определяет важность проведенного исследования для дальнейшего выяснения механизмов влияния МП на растительные объекты.

Наличие достоверных различий по степени эффективности различных частот МП подтверждают биологическую значимость данного параметра и свидетельствуют о необходимости предварительного подбора оптимальных условий воздействия МП для каждого биологического объекта с целью достижения наиболее высоких уровней стимуляции МА. Поскольку достоверные изменения МА под действием МП были отмечены во всех проведенных экспериментах, это позволяет рекомендовать целенаправленное воздействие МП на растения для решения различных прикладных задач.

Полученные данные являются основанием для применения МП в сельскохозяйственной практике и биотехнологии. Стимулирующее действие МП на МА целесообразно применять для повышения эффективности ряда биотехнологических процессов, связанных с размножением клеток. Среди них – наращивание биомассы продуцентов фармакологических, пищевых и других веществ, регенерация целых растений из отдельных клеток, подвергнутых различным биоинженерным операциям, вегетативное размножение и укоренение уникальных экземпляров, получение спорофитов из гаметических клеток, селекция на клеточном уровне, получение полиплоидов и мутантов.

Выводы

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

1. Переменное магнитное поле с частотами из диапазона от 2 до 20 Гц вызывает достоверное повышение уровня митотической активности апикальных корневых меристем проростков чечевицы Надежда.

2. Действие различных частот магнитного поля сопровождается различными уровнями стимуляции митотической активности (от 9 до 36%), при этом наиболее эффективным является воздействие магнитного поля с частотой 20 Гц.

3. При действии низкочастотного магнитного поля могут отмечаться достоверные изменения относительных продолжительностей разных стадий митоза, в частности при действии частот от 14 до 20 Гц наблюдается уменьшение относительной продолжительности профазы.

Библиографический список

1. Холодов Ю.А. Магнетизм в биологии. М.: Наука, 1970. 96 с.
2. Бинги В.Н., Савин А.В. Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы // Успехи физических наук. 2003. т. 173. № 3. С. 265-300.
3. Беркутов А.М., Жулев В.И., Кряков В.Г. и др. Техника комплексной магнитотерапии в XXI веке // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2001. Вып. 7. С. 6-13.

4. Стрекова В.Ю. Влияние постоянных магнитных полей высокой напряженности на митоз в корнях бобов // Электронная обработка материалов. 1967. Вып. 6(18). С. 76-78.
5. Стрекова В.Ю. Митоз и магнитное поле // Проблемы космической биологии. М.: Наука. 1973. т. 18. С. 200-204.
6. Шрагер Л.Н. Цитогенетический эффект действия ослабленного магнитного поля на правые и левые изомеры лука // Материалы Третьего Всесоюзного симпозиума «Влияние магнитных полей на биологические объекты». 17-19 июня 1975. Калининград, 1975. С. 194-195.
7. Новицкий Ю.И., Новицкая Г.В., Кочешкова Т.К. и др. Рост пера лука в слабом постоянном магнитном поле // Физиология растений. 2001. т. 48. № 6. С. 821-828.
8. Беляченко Ю.А., Тырнов В.С., Усанов Д.А. Исследование влияния магнитных полей на митотическую активность клеток растений: Учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2011. 36 с.
9. Усанов А.Д. Исследование влияния переменного магнитного и электрического полей на живые организмы и водную среду с использованием дафнии в качестве биоиндикатора: Дис ... канд. физ.-мат. наук. Саратов, 2004. 103 с.
10. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973. 320 с.

УДК 575.17: 582.632.2

Габитова А.А., Гайнанов С. Г., Ахметов А.Р.
ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, г. Уфа, Россия

ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ В ШИРОКОЛИСТВЕННЫХ ЛЕСАХ НА ВОСТОЧНОЙ ГРАНИЦЕ АРЕАЛОВ

Ключевые слова: генетическая структура; экологические факторы; аллозимные маркеры; электрофоретический анализ.

Введение. В последние десятилетия наблюдается ухудшение состояния насаждений дуба черешчатого на Южном Урале. В этой связи актуальным является исследование факторов, в том числе экологических, обуславливающих изменения в генофонде вида и воздействующих на сложившиеся в ходе микроэволюции генетическое разнообразие и дифференциацию популяций.

Цель исследования – при помощи аллозимных генетических маркеров изучить воздействие экологических условий обитания на генетическое разнообразие и дифференциацию популяций дуба черешчатого на Южном Урале.

Материалы и методы.

Для изоферментного анализа использован полиакриламидный гель-электрофорез [3, 4]. Изучены частоты аллелей 11 популяций из Оренбургской области (пробная площадь условно названа Orb), Зианчуринского (Abz), Зилаирского (Zlr), Кююргазинского (Kmr), Кугарчинского (Ymg), Архангельского (Azv1, Azv 2), Уфимского (Ufa), Бирского (Bir), Татышлинского (Tts) районов Башкортостана и Пермской области (объединенная выборка Prm1,2), расположенные в характерных для дуба черешчатого условиях местообитания. Исследованы также 3 популяции из экологически экстремальной для вида экологической среды, находящиеся на территории Бурзянского (пробная площадь Brz), Баймакского (объединенная выборка Bmk1,2) и Белорецкого (Inz) районов. Гистохимическое выявление зон ферментативной активности в гелях осуществлено по стандартным методикам [1]. Для выделения изоферментов использованы зимние почки. Статистическая обработка результатов анализа осуществлена с применением компьютерной программы BIOSYS-1 [5]. Детальное описание методов экстракции и электрофоретического разделения аллозимов были приведены ранее [2].

Результаты исследований и их обсуждение.

Вычисление параметра уровня межпопуляционной дифференциации F_{ST} для 5 использованных полиморфных локусов (таблица 1) показало, что из совокупной генетической изменчивости к внутривыборочной составляющей относится 9,7 % ($F_{ST}=0,097$). При этом изменения параметра по отдельным локусам доходят до уровня $F_{ST}=0,151$. Этот уровень является сравнительно

Таблица 1 Параметры F -статистики Райта у дуба черешчатого

Локусы	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Skd-1	-0,021	0,042	0,062
Fdh-1	0,164	0,290	0,151
Aap-1	0,168	0,217	0,059
Lap-2	0,110	0,211	0,114
Dia-1	0,175	0,229	0,066
В среднем:	0,139	0,223	0,097

высоким для других видов растений с такими же, как у дуба черешчатого, биоэкологическими свойствами [2].

При анализе одновременно всех 14 выборок не выявлено существование каких-либо закономерностей между уровнем дифференциации популяций и расстояниями между ними. Вычисленный коэффициент корреляции ($r=0,06$) был статистически недостоверным. Нами проведен анализ изменений частот аллелей по градиентам (север-юг, запад-восток), но выраженных тенденций клинального изменения частот аллелей не обнаружено. В то же время наблюдается тенденция относительной близости частот аллозимов некоторых

выборок, находящихся в относительной географической близости друг от друга (группы Orb/Abz, Zlr/Kmr, Tts/Prm1,2, Azv1/Azv2). Генетически близкими между собой по частотам аллелей оказались и три насаждения дуба черешчатого (Tts, Prm1 и Prm2), расположенные в зоне хвойно-широколиственных лесов на севере Башкортостана и примыкающей части Пермской области. В то же время они генетически существенно отличаются от других популяций Башкирского Предуралья Orb, Abz, Zlr, Kmr, Ymg, Azv1, Azv 2, Ufa, Bir. Без учета выборок Tts, Prm1 и Prm2 параметр межпопуляционной подразделенности F_{ST} снижается от 0,070 до 0,54. Построение дендрограммы позволило выявить, что популяции региона кластеризуются на 2 группы. Южные популяции Orb, Abz, Zlr, Kmr, расположенные на Зилаирском плато, отличаются друг от друга всего на уровне $F_{ST}=0,027$. Другая совокупность насаждений широколиственно-лесной зоны, расположенной на более обширном пространстве Башкирского Предуралья (Ymg, Azv1, Azv 2, Ufa, Bir), также генетически относительно мало дифференцирована ($F_{ST}=0,039$).

Далее нами были идентифицированы выборки, нарушающие закономерную географическую структурированность популяций. Ими оказались выборки, взятые из экологических условий, нехарактерных для произрастания дуба черешчатого, и представляющие малые по объему популяции на границе ареала – Inz, Brz, Vm1,2, Prm1,2. Их дифференциация выражена в намного большей степени - $F_{ST}=0,112$.

Местообитание Inz расположено на каменистом крутосклоне и, видимо, представляет наиболее восточную популяцию в пределах Южного Урала (Белорецкий район Башкортостана), не считая отдельных изолированных древостоев с несколькими десятками деревьев. Имеющиеся здесь дубы имеют форму извилистого многоствольного кустарника и, видимо, сильно угнетены жесткостью экологических условий.

Дуб черешчатый на пробной площади Brz, также представляющий одну из крайних популяций на восточной границе ареала вида, имеет нехарактерную стланиковую форму, высота которой, видимо, определяется высотой снежного покрова.

Дубы популяции Vm находятся на значительном удалении от восточной границы ареала вида и отделены от дубняков западного макросклона южно-уральских гор полосой березовых и сосново-березовых лесов шириной более 100 км и, таким образом, представляет пример жесткой географической изоляции. Участок Vm1, расположенный на восточном склоне хр. Ирандык, представляет собой выдел березового насаждения, где экземпляры дуба черешчатого входят в состав древостоя в качестве примеси. Стволы деревьев извилисты, они небольшого размера. Нами здесь обнаружены 27 компактно расположенных особей репродуктивного возраста, а также разновозрастный подрост. Экологические условия в местообитании (горная лесостепь) отличаются от условий, в которых дуб черешчатый обитает в основной части ареала и где расположено большинство других популяций (богатые хорошо дренированные почвы в зоне широколиственных лесов, более мягкие

климатические условия). Насаждение Вm2, включающее всего 7 деревьев, находится в еще более жестких экологических условиях резко континентального и крайне засушливого климата степей Башкирского Зауралья.

Крайне угнетенный вид и нехарактерный для дуба черешчатого габитус деревьев популяций Inz, Brz и Вm свидетельствует об экстремальности для них средовых (экологических) факторов местообитаний. Своеобразие выборок по частотам аллелей изоферментных локусов свидетельствует о том, что такая изменчивость имеет генетическую природу. Учет выявленных закономерностей представляется перспективным для организации экологически ориентированного лесокультурного и лесосеменного дела дуба черешчатого в Башкортостане.

Библиографический список

1. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 275 с.
2. Янбаев Ю.А., Байрамгулов Н.Р., Редькина Н.Н. и др. Межпопуляционная дифференциация родиолы ирмельской (*Rhodiola iredmela* Boriss., *Crassulaceae*) на Южном Урале // Генетика. 2007. Т. 43. № 11. С. 1565-1570.
3. Davis B.J. Disc electrophoresis. 11. Methods and application to human serum proteins // Ann. New York Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 404-427.
4. Ornstein L. Disc-electrophoresis. I. Background and theory // Ann. New York Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 321-349.
5. Swofford D.L., Selander R.B. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetics and systematics // J. Heredity. 1981. V. 72. P. 281-283.

УДК 633.31:631.524.01

Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.)

Ключевые слова: горох; селекция; морфологические признаки; хозяйственно-ценные признаки; микросателлиты; аллель; генотип; полиморфизм.

Введение. Одна из важнейших зернобобовых культур в мире – горох посевной (*Pisum sativum* L.). Зерно гороха – богатейший источник белка, крахмала, витаминов, минеральных и биологически активных веществ [1]. Его производят во многих странах мира. Максимальные площади посевов зернового гороха находятся в Канаде (1322,1 тыс. га), в Китае (882,0 тыс. га), в Индии (650,0 тыс. га). В большом объеме культура возделывается во Франции (250,0 тыс. га), на Украине (278,5 тыс. га), в США (306,0 тыс. га). Посевные

площади зернового гороха в Российской Федерации составляют 820,1 тыс. га, а собираемый урожай – 1,2 млн. тонн в год [2].

Сравнительно низкие урожаи зерна гороха в нашей стране связаны с несовершенством технологий возделывания, отсутствием комплекса уборочных машин [1]. Тем не менее, актуальной задачей селекции на современном этапе является создание новых, высокотехнологичных сортов зернового гороха, наиболее полно реализующих почвенно-климатический потенциал региона и отвечающих требованиям сельскохозяйственного производства [3].

Ключевую роль в создании новых высокопродуктивных и адаптивных сортов должен играть исходный материал для селекции, источником которого служит коллекция гороха ВИР. Генофонд гороха, сохраняемый в коллекции, отражает мировое разнообразие этой ценной, экономически значимой культуры [4]. В настоящее время с развитием молекулярной биологии и генетики появились методы, позволяющие проводить оценку полиморфизма на уровне ДНК. Метод SSR-анализа открывает возможность для простого и быстрого определения генотипов анализируемых форм по локусам микросателлитных повторов. Типирование с помощью микросателлитных маркеров позволяет создавать базы данных для идентификации сортов и линий гороха, а также для дальнейшего планирования эффективных скрещиваний, в которых выявляется наибольший генетический полиморфизм [5].

Цель и задачи исследования.

Целью работы послужило изучение морфологических, хозяйственно-ценных признаков и проведение молекулярно-генетической оценки сортообразцов гороха посевного. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) определить продолжительность вегетационного и межфазных периодов линий и сортов гороха местной, отечественной и зарубежной селекции; 2) провести оценку исследуемых сортообразцов по морфологическим и хозяйственно-ценным признакам; 3) осуществить молекулярное маркирование изученных сортообразцов и исследовать ДНК-полиморфизм гороха посевного.

Условия, материалы и методы исследования

В 2010-2011 годах полевые опыты проводили на полях Чишминского селекционного центра по растениеводству ГНУ Башкирский НИИ сельского хозяйства. Предшественник в опытах – озимые культуры. Посев сортообразцов проводили в полевых условиях в коллекционном питомнике селекционной сеялкой СКС 6-10. Площадь питания растений 20x5 м. Летняя площадь деланки каждого образца составляла 3 м². Стандарт – сорт Чишминский 95.

Погодные условия в 2010 году сложились крайне неблагоприятно для вегетации ранних яровых зерновых культур, особенно для гороха. Затянувшаяся весна и возврат холодов на 8-9 дней отодвинули начало срока сева гороха. К посеву гороха в опытах приступили 8-9 мая. Всходы появились 17-18 мая. Со второй декады установилась жаркая погода при отсутствии

атмосферных осадков. В зоне расположения Чишминского селекционного центра по растениеводству, где ведется селекция гороха, дождей почти не было в продолжение 3-х месяцев (май - июль).

Цветение гороха и первая фаза налива семян проходили в условиях сильной засухи и высокой температуры воздуха.

Эти крайне неблагоприятные условия привели к образованию малого количества бобов (в 3 раза меньше), общего количества семян на растении и их массы (в 3-3,5 раза меньше). В результате этого в 2010 году были получены рекордно низкие урожаи семян гороха – в пределах 8-10 ц/га.

В 2011 году посев селекционных и семеноводческих питомников производился в среднемноголетние сроки 6-8 мая. В период посев – всходы стояла теплая, сухая погода с незначительными дождями. Всходы появились через 12-13 дней. В дальнейшем до фазы цветения растения гороха росли и развивались в условиях достаточного количества влаги и пониженных температур. Наступившая с середины третьей декады июня сухая, жаркая погода вызвала ускоренное развитие растений и преждевременное созревание семян. В этих контрастных условиях развития и роста растений урожайность семян гороха в конкурсном сортоиспытании составила 17-27 ц/га.

В работе было использовано 34 сортообразца гороха посевного (в том числе 28 сортов из коллекции ВИР): 6 сортов и 6 линий местной селекции (Ирэндек, Кормовой 5, Чишминский 80, Чишминский 95, Чишминский 229, Шихан, Л-26742 ((Уладовский Юбилейный × Шихан) × Шихан), Л-27262 (К-7779 х Труженик), Л-29477 (Усач х Кормовой 5), Л-29825 (Л-27264 х Кормовой 5), Л-29865 (Усач х Чишминский 95), Л-30346 (Чишминский 229 х Л-27266)), 7 сортов отечественной селекции (Зеленозерный 1, Труженик, Усатый 90, Усач, Флаванда, Флагман, К-8714 (Адыгея)), 15 сортов зарубежной селекции (Топаз (Украина), Чарльсон (Великобритания), К-6017 (Франция), К-6299 (Марокко), К-6548 (Индия), К-6753 (Чехия), К-7044 (Ливия), К-7779 (Великобритания), К-7899 (Дания), К-7992 (Корея), К-8289 (Нидерланды), К-8500 (Белорусия), К-8750 (Потругалия), К-8814 (США), К-9109 (Украина)).

Полевые опыты проводили на полях Чишминского селекционного центра по растениеводству, структурный анализ растений - в лаборатории селекции и семеноводства зернобобовых культур, оценку ДНК-полиморфизма отобранных образцов - в лаборатории молекулярно-генетической экспертизы ГНУ Башкирский НИИСХ.

Фенологические наблюдения, учеты и измерения проводились по методике ГНУ Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (1985 г.), принятой для коллекционного питомника. Отмечали дату всходов, цветения и полной спелости. За начало каждой из этих фаз принимался день, когда в нее вступают 10–15% растений, а за полное наступление фазы – когда она наблюдается примерно у 75% растений. На основании полученных данных по каждому сорту и линии определялась продолжительность вегетационного периода от всходов до полной спелости.

Ежегодно для характеристики и сравнения сортообразцов по морфологическим признакам и элементам структуры урожая отбирали во время уборки пробные снопы. После просушки растений в снопах проводили структурный анализ по селекционно-ценным признакам 20-25 растений каждого сорта.

Тотальную ДНК выделяли из молодой слабопигментированной ткани пророщенных растений гороха с использованием коммерческого набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas»). Для анализа было использовано 5 микросателлитных локусов. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «ДТ-322» фирмы «ДНК-Технология» по программе: денатурация при 94°C - 1 мин.; 3 цикла: денатурация при 94°C - 30 сек., отжиг праймеров при 58°C - 20 сек., элонгация при 72°C - 5 сек.; 33 цикла: денатурация при 94°C - 15 сек., отжиг праймеров при 58°C - 20 сек., элонгация при 72°C - 1 мин.; конечная элонгация при 72°C - 30 мин.

Продукты амплификации с длиной амплифицируемого фрагмента менее 250 п.н. разделяли электрофоретически в 6% неденатурирующем полиакриламидном геле, а с длиной фрагмента более 250 п.н. – в 3% агарозном геле. Горизонтальный электрофорез проводили при напряженности электрического поля 120 В в течение 3-4 часов, вертикальный электрофорез – при 300 В в течение 3-3,5 часов.

Результаты и их обсуждение

Фенология сортов и линий гороха посевного

Продолжительность вегетационного и межфазных периодов гороха определяется сортовыми свойствами и их взаимодействием с условиями окружающей среды. При обеспеченности влагой семена гороха прорастают при температуре 1-2°C, но для последующего роста уровень ее должен быть на 3-4°C выше. Решающее влияние на быстроту появления всходов в наших условиях оказывает среднесуточная температура, запасы влаги в пахотном слое почвы перед посевом должны быть достаточны.

Продолжительность периода от всходов до цветения зависит от условий года и в большей степени определяется генотипом. Учитывая резко меняющуюся тепло- и влагообеспеченность в Предуральской степной подзоне Башкортостана, особенно важно иметь сорта с более стабильным периодом от всходов до цветения в разные годы.

В период от цветения до созревания в процессе онтогенеза потребность гороха в тепле наиболее высока. Нижний предел температуры для него должен быть не менее 10°C, а оптимальный уровень составляет 18-20°C [6].

В наших опытах продолжительность полного вегетационного периода зависела от условий выращивания и сортовых особенностей, причем последние играют ведущую роль. Продолжительность вегетационного периода у каждого сортообразца изменялась по годам в зависимости от обеспеченности теплом и количеством осадков в период от цветения до созревания. Так, погодные условия, сложившиеся в период вегетации гороха в 2010 г., несколько

сократили продолжительность вегетационного периода у изученных сортообразцов.

В результате фенологических наблюдений в среднем за 2010-2011 гг. нами были выделены наиболее скороспелые сортообразцы: Л-27262 (К-7779 х Труженик), Л-29477 (Усач х Кормовой 5), Л-29825 (Л-27264 х Кормовой 5), Л-29865 (Усач х Чишминский 95), К-6753 (Чехия).

Анализ морфологических и хозяйственно-ценных признаков сортов и линий гороха посевного

Одним из основных признаков, характеризующих хозяйственную ценность сорта, является его урожайность, которая зависит от количества плодоносящих растений на единицу площади и веса семян на 1 растении (продуктивности). Продуктивность определяется несколькими ее составляющими – количеством продуктивных узлов на растении, бобов на один продуктивный узел, семян в бобе, или наполненностью боба, массой 1000 семян (крупностью) [6].

В 2010-2011 гг. среди исследованных нами сортообразцов короткостебельностью отличались Чарльсон (Англия), К-6753 (Чехия), К-8289 (Нидерланды), Флаванда, К-8714 (Адыгея).

По количеству продуктивных узлов в среднем за 2 года выделились сортообразцы Шихан, Чишминский 95, К-6753 (Чехия), К-8750 (Португалия), К-8500 (Белоруссия).

Наибольшим количеством бобов на растение в 2010-2011 гг. характеризовались сортообразцы Чишминский 229, Флаванда, К-6753 (Чехия), К-8500 (Белоруссия), Чишминский 80, Шихан.

В среднем за 2010-2011 гг. наибольшим количеством семян с растения обладали сортообразцы Чишминский 229, Ирэндек, Зеленозерный 1, К-7779 (Великобритания), Чишминский 95.

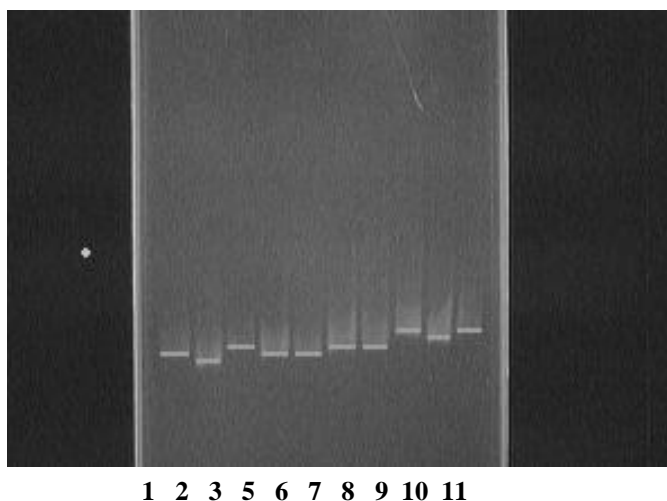
Наибольшее количество семян в бобе в 2010-2011 гг. было отмечено у сортообразцов К-6017 (Франция), Зеленозерный 1, К-7992 (Корея), Ирэндек, К-6299 (Марокко), Л-27262 (К-7779 х Труженик).

По массе семян с растения в среднем за 2 года выделились следующие сортообразцы: Чишминский 229, Чишминский 95, Чишминский 80, Шихан, К-8750 (Португалия), К-8500 (Белоруссия).

В 2010-2011 гг. наибольшей массой 1000 семян отличались сортообразцы К-8714 (Адыгея), Топаз (Украина), К-7899 (Дания), Флаванда, Флагман.

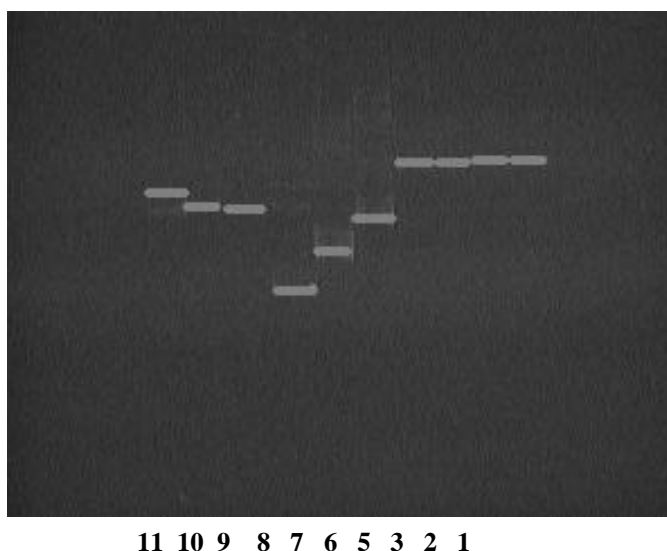
Микросателлитный анализ сортов и линий гороха посевного

В результате молекулярно-генетического исследования 34 сортообразцов гороха посевного методом SSR-PCR нами были получены данные по аллельному состоянию 5 микросателлитных локусов (AA255, AA200, D21, AD147, AB28). Все проанализированные образцы отличались уникальным сочетанием аллелей, а сами аллели хорошо распознавались при повторных анализах (рис. 1, 2).



- Обозначения:
- 1 - Чарльсон (Англия),
 - 2 - К-7992 (Корея),
 - 3 - К-9109 (Украина),
 - 5 - К-6017 (Франция),
 - 6 - К-6299 (Марокко),
 - 7 - К-6548 (Индия),
 - 8 - К-6753 (Чехия),
 - 9 - К-7044 (Ливия),
 - 10 - К-7899 (Дания),
 - 11 - К-8289 (Нидерланды).

Рис. 1. SSR-спектры сортообразцов гороха в агарозном геле, полученные при амплификации локуса AA200.



- Обозначения:
- 1 - Чарльсон (Англия),
 - 2 - К-7992 (Корея),
 - 3 - К-9109 (Украина),
 - 5 - К-6017 (Франция),
 - 6 - К-6299 (Марокко),
 - 7 - К-6548 (Индия),
 - 8 - К-6753 (Чехия),
 - 9 - К-7044 (Ливия),
 - 10 - К-7899 (Дания),
 - 11 - К-8289 (Нидерланды).

Рис. 2. SSR-спектры сортообразцов гороха в полиакриламидном геле, полученные при амплификации локуса D21.

Данные по генотипированию изученных нами сортообразцов гороха посевного приведены в таблице 1. Полученная матрица представляет собой базу данных по аллельным состояниям исследованных микросателлитных маркеров и является основой для расчета уровня внутривидовой изменчивости гороха посевного и определения сортовой принадлежности образцов.

Число аллелей, амплифицирующихся в конкретном локусе, менялось от 3 (AA255, AA200) до 7 (D21). Число полученных аллелей составило 23, то есть в среднем 4,6 аллелей на локус. Для каждого локуса рассчитывали индекс полиморфизма PIC (Polymorphism information content) по формуле:

$$PIC = 1 - \sum (p_i)^2, \text{ где } p_i - \text{частота аллеля.}$$

В наших исследованиях индекс полиморфизма менялся от 0,41 (AA200) до 0,78 (AD147), составляя в среднем 0,64.

Таблица 1 Аллельные варианты микросателлитных локусов

Название локуса	AA255	AA200	D21	AD147	AB28
Ирэндек	3	1	9	3	4
Кормовой 5	2	3	6	3	5
Чишминский 80	2	3	2	3	5
Чишминский 95	2	3	2	2	4
Чишминский 229	2	3	2	1	2
Шихан	1	2	6	2	4
Л-26742 ((Ул. Юб. × Шихан) × Шихан)	3	1	3	2	3
Л-27262 (К-7779 × Труженик)	2	3	2	3	1
Л-29477 (Усач × Кормовой 5)	2	1	3	2	5
Л-29825 (Л-27264 × Кормовой 5)	2	1	2	4	2
Л-29865 (Усач × Чишминский 95)	2	3	2	5	2
Л-30346 (Чишминский 229 × Л-27266)	3	3	2	2	2
Зеленозерный 1	2	3	9	1	4
Труженик	2	3	7	2	5
Усатый 90	2	3	3	5	4
Усач	2	1	2	3	3
Флаванда	3	3	6	4	4
Флагман	2	3	7	4	5
К-8714 (Адыгея)	2	3	2	4	2
Топаз (Украина)	2	3	2	4	4
Чарльсон (Англия)	2	1	9	2	2
К-6017 (Франция)	2	3	9	2	3
К-6299 (Марокко)	2	3	6	2	3
К-6548 (Индия)	2	3	4	3	1
К-6753 (Чехия)	1	3	2	3	4
К-7044 (Ливия)	1	3	7	5	4
К-7779 (Великобритания)	3	3	2	4	4
К-7899 (Дания)	2	2	7	4	3
К-7992 (Корея)	2	1	9	1	3
К-8289 (Нидерланды)	1	3	8	5	5
К-8500 (Белоруссия)	2	3	7	2	3
К-8750 (Португалия)	2	3	2	1	3
К-8814 (США)	2	3	9	1	3
К-9109 (Украина)	3	3	9	3	2
Число аллелей	3	3	7	5	5
РIS	0,46	0,41	0,77	0,78	0,77

Определение сортовой принадлежности по молекулярным маркерам является наиболее быстрым и эффективным методом идентификации сортов. В данной работе мы определяли возможность идентификации с помощью пяти

SSR-маркеров 6 линий и 28 сортов гороха посевного местной, отечественной и зарубежной селекции. Мы установили, что для однозначной идентификации исследованных сортообразцов, было достаточно использовать выбранный нами набор микросателлитных маркеров, то есть сочетание аллелей по данным локусам было уникальным для каждого сорта и линии. Кроме того, было показано, что линии и сорта гороха местной, отечественной и зарубежной селекции значительно различаются по представленности аллелей отдельных локусов. На рисунках 3, 4, 5 отображены данные по распределению частот аллелей у изученных нами сортообразцов гороха посевного по локусу D21.

Рис. 3. Частоты аллелей локуса D21 у сортообразцов гороха посевного местной селекции.

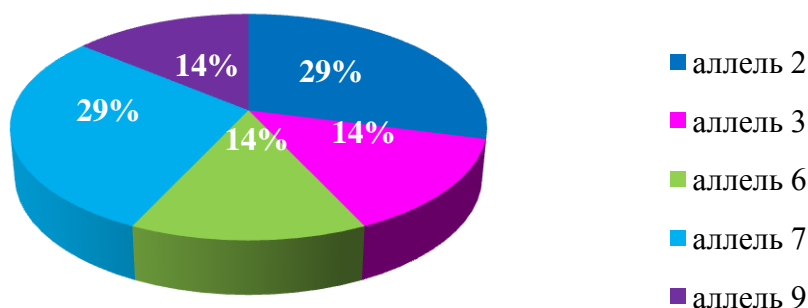


Рис. 4. Частоты аллелей локуса D21 у сортообразцов гороха посевного отечественной селекции.

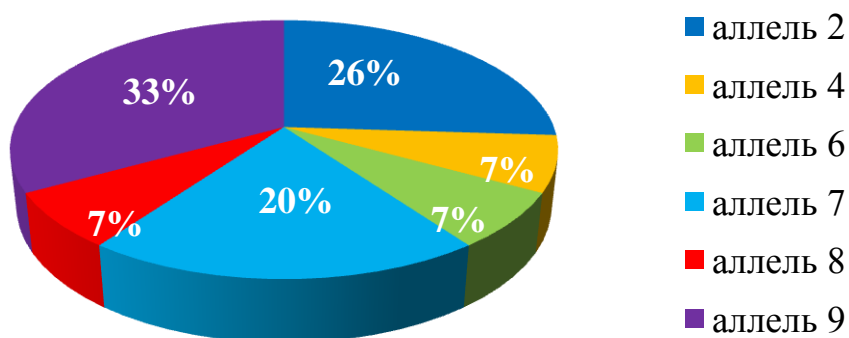


Рис. 4. Частоты аллелей локуса D21 у сортообразцов гороха посевного зарубежной селекции.

Выводы

1. В процессе изучения коллекционного материала гороха посевного (*Pisum sativum* L.) выделены следующие перспективные источники:

- скороспелые: Л-27262 (К-7779 x Труженик), Л-29477 (Усач x Кормовой 5), Л-29825 (Л-27264 x Кормовой 5), Л-29865 (Усач x Чишминский 95), К-6753 (Чехия);

- с максимальным количеством продуктивных узлов: Шихан, Чишминский 95, К-6753 (Чехия), К-8750 (Португалия), К-8500 (Белоруссия);
- с наибольшим количеством бобов на растение: Чишминский 229, Флаванда, К-6753 (Чехия), К-8500 (Белоруссия), Чишминский 80, Шихан;
- с наибольшим количеством семян с растения: Чишминский 229, Ирэндек, Зеленозерный 1, К-7779 (Великобритания), Чишминский 95;
- с максимальной массой 1000 семян: К-8714 (Адыгея), Топаз (Украина), К-7899 (Дания), Флаванда, Флагман;
- с наибольшей массой семян с растения: Чишминский 229, Чишминский 95, Чишминский 80, Шихан, К-8750 (Португалия), К-8500 (Белоруссия).

2. Молекулярно-генетический анализ 34 сортообразцов гороха по 5 микросателлитным локусам показал среди них наличие выраженной генетической дифференциации. В каждом из 5 изученных микросателлитных локусов идентифицировано от 3 до 7 аллелей, в среднем 4,6 аллелей на локус. Средний уровень полиморфизма по SSR-маркерам среди изученных форм составляет 64%.

3. Для зарубежных сортообразцов К-6548 (Индия) и К-8289 (Нидерланды) показано наличие «приватных» аллелей по локусу D21.

4. Установлено, что для однозначной идентификации исследованных нами сортообразцов гороха достаточно использовать 5 микросателлитных локусов - AA255, AA200, D21, AD147, AB28.

Рекомендации селекционной практике

В результате проведенной работы были выделены и рекомендованы для использования в селекции источники ценных свойств и признаков. Составлена база данных, представляющая собой молекулярно-генетическое описание исследованных сортообразцов гороха, которая может быть использована для создания системы их идентификации и паспортизации. Прделанная работа обеспечивает основу для дальнейшего планирования эффективных скрещиваний, в которых выявляется наибольший генетический полиморфизм.

Библиографический список

1. Давлетов Ф.А. Селекция неосыпающихся сортов гороха в условиях Южного Урала. – Уфа, 2008. - 231 с.
2. <http://faostat.fao.org>.
3. Давлетов Ф.А., Ашиев А.Р. Оценка селекционной ценности новых линий гороха посевного//Развитие научного наследия Н.И. Вавилова в современных селекционных исследованиях: материалы Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова. – Казань: Центр инновационных технологий, 2012. – 208 с.
4. Соболев Д.В. Разнообразие гороха (*Pisum sativum* L.) восточно-европейской селекции в эколого-географическом изучении: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – СПб., 2009. – 22 с.

5. Дрибноходова О.П. Анализ ДНК-полиморфизма гороха посевного (*Pisum sativum* L.): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2009. – 24 с.

6. Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П., Ашиев А.Р. Особенности роста и развития сортов и линий гороха различных морфотипов в условиях южного Урала // *Зерновое хозяйство России*. – 2011. - № 5. - С. 38-57.

УДК 575.174: 577.2

Зарецкая¹ М. В., Курбидаева² А. С, Новокрещенова² М. Г., Куприянова² Е. В.,
Ежова² Т. А., Федоренко¹ О. М.

¹ФГБУН «Институт биологии», Петрозаводск, Россия

² «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
Россия, г.Москва

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АДАПТАЦИИ: ВРЕМЯ ЦВЕТЕНИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ХОЛОДУ У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.)

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (L.); природные популяции; время начала цветения; яровизация; экспрессия генов *FLC* и *ICE2*; устойчивость к холоду.

Введение. Генетические механизмы, лежащие в основе адаптивного полиморфизма представляют особый интерес для изучения, поскольку обеспечивают приспособленность живых организмов к внешним условиям среды. Идеальным объектом генетических исследований является модельное растение из семейства крестоцветных *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Это растение имеет обширный ареал распространения, что позволяет проводить популяционно-генетические исследования с использованием молекулярно-генетических методов. Для исследования адаптаций наибольший интерес представляют краевые популяции *A. thaliana*. К таким областям относится территория Карелии, являющаяся северной периферией ареала вида.

Одна из важнейших физиологических характеристик растений – время начала цветения – определяет их адаптацию к условиям окружающей среды. Этот признак характеризуется полигенным наследованием, однако два гена являются определяющими в естественной изменчивости растений по темпам зацветания – *FRIGIDA* (*FRI*) и *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) [5]. Причем, примерно 70% изменчивости по этому признаку является результатом аллельной изменчивости локуса *FRI*, а сам локус находится под жестким селективным давлением [4, 9]. В природе растения *A. thaliana* представлены озимыми и яровыми формами, различия между которыми определяются аллелями генов *FRI* и *FLC*. Для озимых растений характерны доминантные аллели *FRI* и *FLC*, в то время как у яровых форм присутствуют нефункциональные аллели *fri* или аллели *flc* с низкой функциональной активностью. Локус *FRI* предотвращает раннее цветение арабидопсиса без яровизации, поддерживая высокую экспрессию гена *FLC*, который в свою очередь, кодирует белок с MADS-доменом, репрессирующий цветение [8].

Не менее важную роль в адаптации растений северным условиям обитания играют генетические механизмы устойчивости к холоду, который, с одной стороны, инициирует цветение озимых форм, а с другой – может вызывать гибель растений. Развитие устойчивости *A. thaliana* к холоду в ответ на стресс – это тонко регулируемый механизм, основными действующими элементами которого являются гены регулона *CBF/DREB1*. *CBF* – это гены семейства транскрипционных факторов, экспрессия которых повышается в течение 15 мин после воздействия пониженной температуры. Они контролируют экспрессию генов дегидринов – основных белков, обеспечивающих устойчивость растения к холодовому стрессу. Гены *CBF* находятся под контролем транскрипционных факторов семейства ICE. Основная роль в регуляции всего регулона *CBF/DREB1* принадлежит гену *INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 (ICE1)*. Ген *ICE2* – близкий гомолог *ICE1*, его предположительная роль состоит в активации экспрессии гена *CBF1*. Трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие этот ген, имеют повышенную устойчивость к холоду после акклиматизации [3].

В настоящей работе приведены результаты изучения разнообразия карельских популяций арабидопсиса по срокам начала цветения, устойчивости к холоду и их молекулярные основы. В задачи работы входило исследование влияния разной длительности яровизации на время зацветания растений природных карельских популяций, анализ уровня экспрессии генов *FRI* и *FLC*, контролирующих время зацветания, а также анализ уровня экспрессии генов, контролирующих устойчивость к холоду: *ICE1* и *ICE2*.

Материалы и методы

Анализировали растения *A. thaliana* из шести популяций, находящихся в Карелии. Две популяции расположены на островах Онежского озера Радколье и Большой Климецкий; континентальные популяции Медвежьегорск, Кончезеро, Царевичи и Шуйская названы в соответствии с близлежащими населенными пунктами. В качестве контроля использовали растения раннецветущих экотипов Dj-M и Cvi.

Время зацветания определяли в лабораторных условиях у 30 растений каждой популяции, не подвергавшихся холодовой обработке и у 30 растений, намоченные семена которых были яровизированы в течение 40 дней при 4°C.

Выделение РНК проводили на 3-недельных проростках, используя набор фирмы «Qiagen» (Германия). Количество РНК определяли спектрофотометрически. Первую цепь кДНК синтезировали с помощью реактивов и протокола фирмы «Силекс». ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на амплификаторе АНК-32 (Россия) с набором реактивов для ПЦР-РВ фирмы Синтол (Россия). Для определения уровня экспрессии генов использовали праймеры: *FLC* f: 5'-GATTTGTCCAGCAGGTGACATCTC-3', r: 5'-TTCTCCAAACGTCGCAACGGTCTC-3', *FRI* f: 5'-TGACTGGGCTTCCGTTTTC-3', r: 5'-GCTCTTGGTCATCTGGATTCTCT-3', *ICE1* f: 5'-CCCATTA AACAGCTGATCACA-3', r: 5'-

CCAGCAAGCTAGAGTTGAGGTT-3', ICE2 f: 5'-TAAAGGCCAACAACCAAGAGTT-3', r: 5' TAATCACCGCTTGTGTAACATC-3'. Детекция продуктов реакции осуществлялась с помощью красителя SYBR (Синтол, Россия). Анализ относительного содержания транскриптов проводился с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$, основанного на нормализации данных по экспрессии относительно двух референсных генов. Рассчитывалась разница значений C_t (ΔC_t) между целевым и референсными генами, затем сравнивались значения ΔC_t контрольного и опытного образцов. В качестве референсных использованы гены *PP2A* и *At5g46630*, которые характеризуются конститутивной экспрессией [2].

Результаты и обсуждение

Проведен анализ полиморфизма по времени цветения растений островных и континентальных популяций *A. thaliana*, растущих на северной периферии ареала вида. Установлено, что карельские популяции представлены в основном поздноцветущими (озимыми) формами. Без предварительной холодной обработки семян растения популяций Климецкий, Кончезеро, Шуйская, Медвежьегорск зацвели через 90–180 дней (рис.1А). Растения естественных популяций *A. thaliana* считаются раннецветущими, если зацветают в течение 28–75 дней от прорастания. В популяции Радколье только 7 % растений зацвели через 75–90 дней, а остальные – через 90–180 дней. Популяция Царевичи оказалась полиморфной по времени цветения. Она представлена и поздноцветущими и относительно раннецветущими (яровыми) формами: 16 % растений зацвели на 36–45 день, через 75 дней зацвела большая часть растений этой популяции, на долю поздноцветущих (90 дней и более) приходилось 13,5 %.

Известно, что локус *FRI* наиболее часто отвечает за потребность в яровизации среди поздних экотипов Центральной Европы и Скандинавии и является доминантным [1]. Эффект позднего цветения *FRI*-локуса полностью элиминируется 40-дневной холодной обработкой [6]. Поскольку большая часть растений *A.thaliana* северных широт являются озимыми, проведен учет времени цветения растений после 40-дневной холодной обработки семян. Во всех популяциях наблюдалось ускорение цветения, однако влияние холодной обработки на популяции было различным. В шести карельских популяциях 40-дневная яровизация показала, что наибольшее влияние, она имела в популяциях Радколье и Царевичи, растения которых почти все зацвели в течение месяца (рис. 1Б). Большая часть растений трех популяций (Кончезеро, Медвежьегорск и Климецкий) зацвели в течение одного – двух месяцев. Существенное увеличение доли раннецветущих растений в этих популяциях после яровизации позволяет предположить, что в них высока частота доминантного *FRI*-аллеля. Популяция Шуйская оказалась менее чувствительной к яровизации (только 29% растений зацвели через 20-45 дней, 48% - через два месяца и 23% - через 60-75 дней). По всей вероятности, в популяции Шуйская, где эффект от яровизации был ниже, существенный вклад в контроль за временем цветения вносят и другие гены *FRI*-, *SWR1*-, *PAF1*-комплексов. Высокая частота

относительно ранних форм арабидопсиса в популяции Царевичи может быть следствием накопления мутантных аллелей по локусу *FLC*.

В связи с этим, исследован уровень экспрессии гена *FLC* – центрального репрессора цветения, в природных популяциях *A. thaliana*. В качестве контроля использовали растения расы Dj-M (Европа), которая имеет делецию в регуляторной области гена *FRI* и характеризуется ранним зацветанием, а также расу Cvi (острова Кабо Верде), имеющую функционально активный аллель *FLC*, приводящий к более позднему зацветанию [4]. Установлено, что ген *FLC* у растений всех популяций Карелии (на стадии 3 недельных проростков) экспрессировался на более высоком уровне по сравнению с рано зацветающими растениями расы Dj-M (рис. 2). В растениях популяции Царевичи, которая отличается от других карельских популяций более ранним зацветанием, уровень экспрессии *FLC*, оказался ниже, чем у остальных карельских популяций, но выше в 6 раз, чем у расы Dj-M и примерно в 2 раза ниже, чем у расы Cvi. После кратковременного воздействия низких положительных температур отмечено снижение экспрессии гена *FLC* у всех исследуемых растений. Однако такое непродолжительное воздействие холодом не приводит к резкому снижению уровня *FLC* и значительному ускорению зацветания.

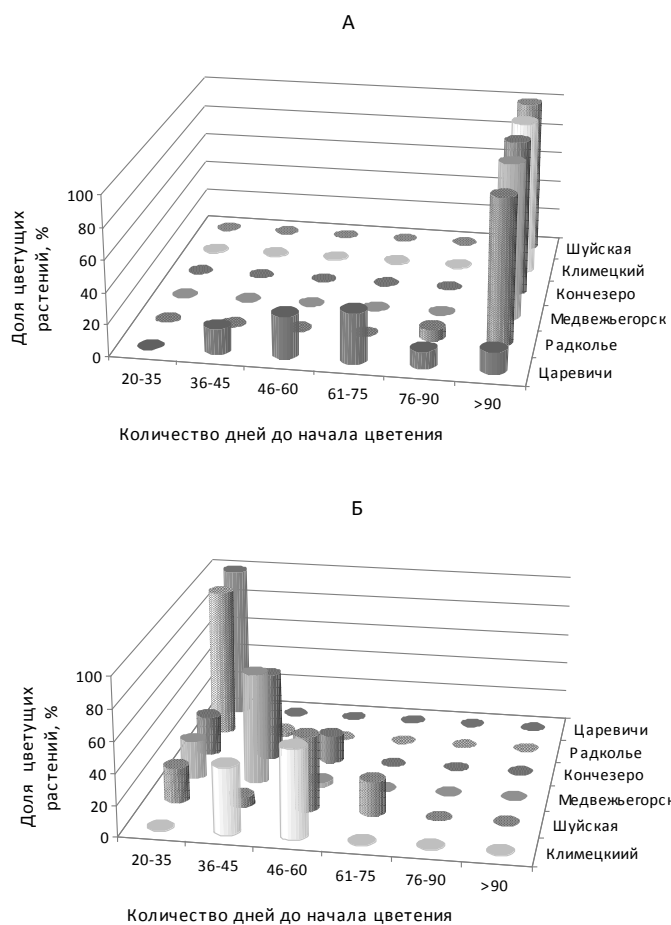


Рис. 1. Полиморфизм карельских популяций *A. thaliana* по времени начала цветения растений: А – без предварительной холодной обработки; Б – яровизация 40 суток при 4°C.

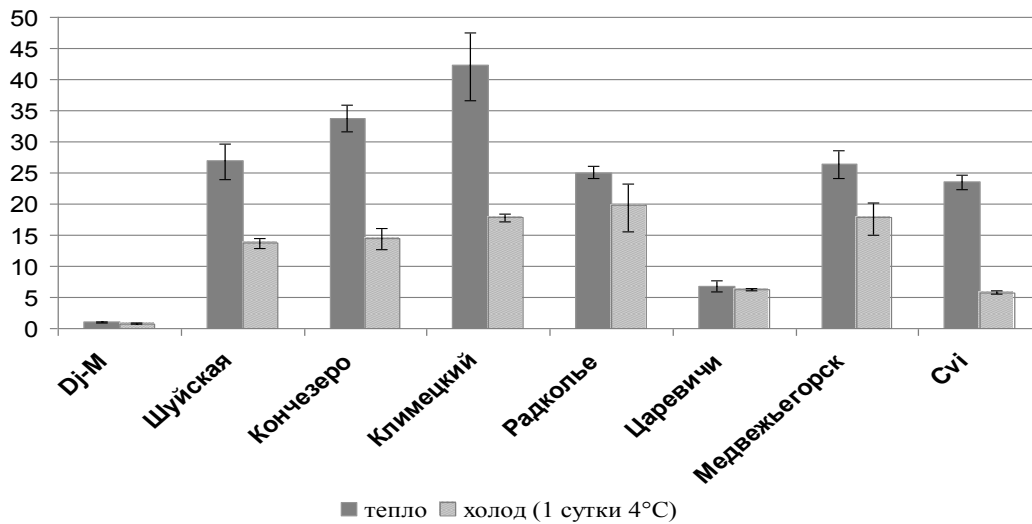


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии гена *FLC*. Здесь и на рис. 3 по оси Y – относительный уровень транскрипции исследуемого гена. За единицу принят уровень транскрипции гена в растении Dj без холодного воздействия. Бары – стандартная ошибка 2-х биологических повторностей.

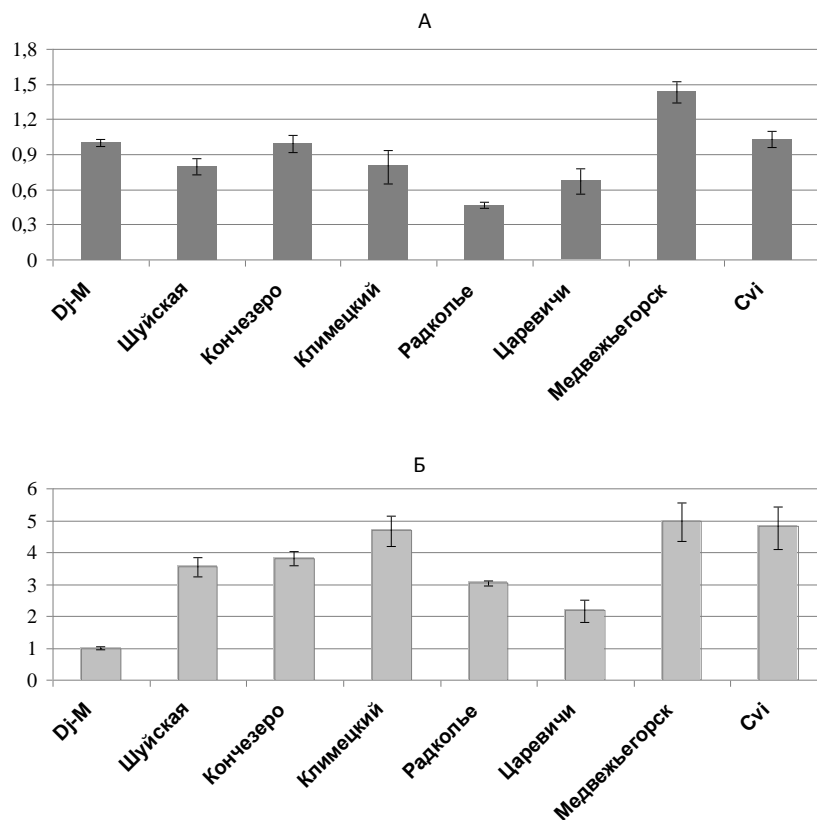


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов, контролирующих устойчивость к холоду. А – *ICE1*; Б – *ICE2*.

Изучение генов *ICE1* и *ICE2*, контролирующих устойчивость к холодному стрессу показало, что уровень экспрессии *ICE1* значительно не отличается в растениях исследованных рас и популяций (рис. 3А). В то же время, уровень экспрессии *ICE2* в растениях карельских популяций и расы Cvi повышен в 2,3 – 5 раз относительно Dj-M (рис. 3Б). Интересно отметить, что наибольший

уровень экспрессии (в 5 раз) отмечен у растений популяции Медвежьегорск, самой северной из исследованных. Наименьший уровень экспрессии – в 2,3 раза – у растений популяции Царевичи, среди которых преобладают раннецветущие растения.

Недавно показано существование взаимосвязи между экспрессией генов холодового ответа и цветения [7]. Наша работа подтверждает наличие этой связи. У растений популяции Царевичи, характеризующихся более ранним цветением по сравнению с остальными карельскими популяциями, отмечено снижение уровня экспрессии генов *FLC* и *ICE2*.

Выводы. Таким образом, позднее цветение растений карельских популяций контролируется, вероятно, функционально активной доминантной аллелью гена *FRI*, задерживающей цветение, о чем свидетельствует высокий уровень экспрессии гена *FLC* большинства растений северных популяций *A. thaliana*. Более раннее цветение растений популяции Царевичи объясняется пониженным уровнем экспрессии *FLC*. Устойчивость к холоду растений северных популяций, вероятно, связана с повышенной экспрессией *ICE2*, уровень которой, по-видимому, зависит от уровня экспрессии *FLC*. Выявленные особенности экспрессии генов, контролирующих устойчивость к холоду и потребность к яровизации, могут служить основой адаптации растений *A. thaliana* к северному ареалу обитания.

Библиографический список

1. Clarke J. H., Dean C. Mapping *FRI*, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana* // Molecular and General Genetics. 1994. V. 242. P. 81–89.
2. Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Michael K. et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2005. V. 139. P. 5–17.
3. Fursova O.V., Pogorelko G.V., Tarasov V.A. Identification of *ICE2*, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* // Gene. 2009. V. 429. P. 98–103.
4. Gazzani S. Gendall A. R., Lister C., Dean C. Analysis of the molecular basis of flowering time variation in *Arabidopsis* accessions // Plant Physiology. 2003. V. 132. P. 1107–1114.
5. Lee I., Bleecker A., Amasino R. Analysis of naturally occurring late flowering in *Arabidopsis thaliana* // Molecular and General Genetics. 1993. V. 237. P. 171–176.
6. Lee, I., Amasino, R.M. Effect of vernalization, photoperiod and light quality on the flowering phenotype of *Arabidopsis* plants containing the *FRIGIDA* gene // Plant Physiology. 1995. V.108. P. 157–162.
7. Seo E., Lee H., Jeon J., Park H. et al. Crosstalk between cold response and flowering in *Arabidopsis* is mediated through the flowering-time gene *SOC1*

- and its upstream negative regulator *FLC* // *The Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 3185–3197.
8. Sheldon C. C., Burn J. E., Perez P. P. et al. The *FLC MADS* box gene. A repressor of flowering in *Arabidopsis* by vernalization and methylation // *Plant Cell*. 1999. V. 11. P. 445–458.
 9. Shindo Ch., Aranzana M. J., Lister C. et al. Role of *FRIGIDA* and *FLOWERING LOCUS C* in determining variation in flowering time of *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. 2005. V. 138. P. 1163–1173.

УДК 575.17: 502.75

Киньябулатов С.С.

Зауральский филиал Башкирский ГАУ, г. Сибай

СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА *INULA HELENIUM* L. В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН НА ПОПУЛЯЦИОННОЙ ОСНОВЕ

Ключевые слова: девясил высокий; популяции, сохранение генофонда.

Девясил высокий (*Inula helenium* L.) - ценное лекарственное растение, нуждающееся на территории Республики Башкортостан в особом внимании к его состоянию в природной среде и мониторинге (приказ Минэкологии РБ № 309п от 1 июня 2011 г.).

В Республике Башкортостан в отношении охраны девясила высокого проводятся определенные работы. Однако их направленность носит некоторый «ресурсный» оттенок. Например (http://www.wwf.ru/ural_econet), популяции у сел Б. Куганак и Аючево в Стерлитамакском районе (21 и 9 га) предложены в качестве ценных объектов для учреждения заказника. В долинах рек Белая, Куганак, Сухайля, Ашкадар и Уршак большие площади (9000, 6500, 1200, 610 и 5300 га, соответственно) рекомендованы для охраны и рационального использования популяций девясила высокого как «местообитания фоновых, ресурсных и редких видов растений (девясил высокий и др.)». Эти предложения, как и в случае с региональным Законом «Об особо охраняемых природных территориях в Республике Башкортостан», поддержаны субъектом Федерации (Постановление Правительства Республики Башкортостан от 1 сентября 2003 г. № 209 «Об утверждении концепции системы охраняемых природных территорий в Республике Башкортостан»).

Относительно высокое аллозимное разнообразие на видовом и популяционном уровнях и общность в целом генетической структуры популяций [1,2,3,4] показывают, что генофонд *Inula helenium* L. на территории Республики Башкортостан находится в сравнительно благополучном состоянии, что позволило нам разработать нижеприведенную рекомендацию.

Рациональное использование ресурсов лекарственного растения девясила высокого в районах Республики Башкортостана, где имеются обширные запасы

вида, видимо, должно быть связано с бережной эксплуатацией природных местообитаний, и, поэтому при сохранении и использовании генетических ресурсов девясила высокого на Южном Урале вне природных условий необходимо использование популяционного подхода и проведение отбора популяций с наиболее типичным генофондом.

В лесостепной и, особенно, в степной зоне Башкирского Предуралья, а также в Башкирском Зауралье представляет особый интерес создание специализированных хозяйств (в том числе фермерских) и плантаций для выращивания лекарственного сырья вне природных популяций. В этом случае, исходя из полученных нами сведений [1] необходимо рекомендовать отбор исходного материала на популяционной основе и из популяций с относительно большой эффективной численностью, со сравнительно богатым генофондом, избегать использования для этого местообитаний с нетипичным генофондом. Особенно данное предложение актуально для условий Башкирского Зауралья, где популяции более малочисленны, изолированы обширными степными пространствами, число особей в каждом местообитании ограничено.

Для устранения последствий наблюдающейся тенденции дисбаланса генотипического состава у девясила высокого представляет интерес использование предложения, выдвинутого в аналогичных целях Н.Р. Байрамгуловым для интродукции эндемика Южного Урала родиолы ирмельской *Rhodiola iremelica* Boriss. [5]. Вид когда-то обладал обширными популяциями, но в послеледниковый период был вытеснен в высокогорья. При этом численность растений сократилась на 1-2 порядка, а некоторые местообитания исчезли. Н.Р. Байрамгуловым установлено, что этот вид, как и девясил высокий, обладает высоким генетическим разнообразием. Однако основная часть аллелей являются редкими и в изменчивых локусах чаще доминирует один из аллелей. Их распределение близко к картине, наблюдаемой в малых популяциях при дрейфе генов. Как и у изученного нами вида, частоты аллелей и генотипов изменялись в популяциях без каких-либо пространственных закономерностей, как и половая и возрастная структуры местообитаний. Значения параметров генетического разнообразия в выборках также значительно различались, что возможно связано с резким падением численности особей. Во многих популяциях родиолы ирмельской выявлены нарушения правила Харди-Вайнберга – не только из-за их малого объема по естественным причинам, но и вследствие хищнических заготовок этого популярного лекарственного растения. На основании этих результатов нами предложено сочетать охрану генофонда природных популяций с сохранением генетических ресурсов в искусственной среде *ex situ*. Для этого рекомендовано создать в условиях культуры «синтетическую» популяцию большого объема. Для увеличения вероятности отбора разных генотипов отбираемые растения должны быть пространственно удалены друг от друга, так как в природных условиях выявлено, как и в случае с девясилом высоким, возрастание генетического родства растений на близких дистанциях. Предложено включение в искусственную популяцию для ее интродукции растения из максимального числа выборок. За счет компьютерного моделирования и

перебора в разных комбинациях генотипов различных популяций было установлено достижение при этом наибольшего генетического разнообразия, оптимизации генетической, половой и возрастной структур, большего баланса генотипического состава. Эту методологию и методику можно, видимо, использовать и для малых изолированных зауральских популяций девясила высокого. В результате возможно избежать ситуации, когда популяции ограниченного объема и небольшой эффективности (рис. 1), расположенные даже на недалеком удалении друг от друга имеют сильно различающийся генотипический состав. При этом будет снят эффект чрезмерного влияния малого числа особей на формирование неслучайной пространственной структуры генотипов. Реализация этой рекомендации важна и по той причине, что девясил высокий из условий культуры интенсивно распространяется, бесконтрольно формируя популяции в новых местообитаниях.

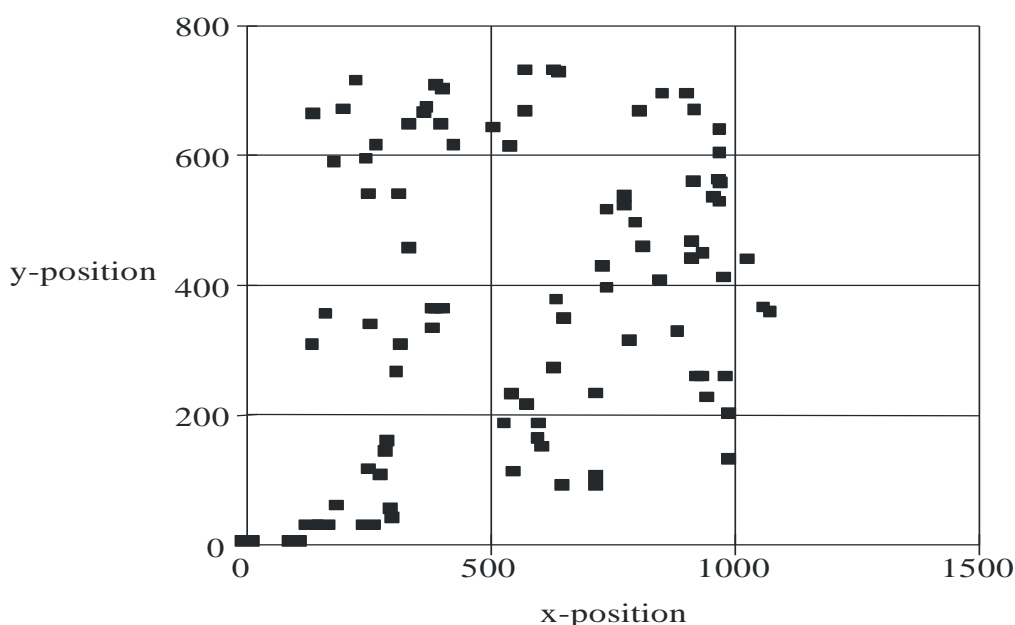


Рис. 1. Схема размещения популяции *Inula helenium* L. из Баймакского района (в 9 км к северу-западу от д. 1-ое Иткулово) с малым числом особей (расстояния в см)

Дополнительным аргументом для плантационного выращивания девясила высокого в Башкирском Зауралье является его сравнительно высокая продуктивность (табл. 1), что подтверждают биометрические исследования.

По всем десяти исследованным морфологическим параметрам популяции Башкирского Зауралья обладают наибольшей продуктивностью надземных органов, вес которых коррелирует с подземной биомассой растения [6], используемой в качестве лекарственного сырья. Для получения дополнительного подтверждения этой закономерности нами произведено объединение данных по продуктивности растений по принципу Башкирское Зауралье/все остальные выборки – группы 1 и 2, соответственно (табл. 2).

Таблица 1

Статистические параметры морфологических признаков
Inula helenium L.

Параметры	Группы	$M \pm m$	<i>Lim</i>	<i>CV</i>
Высота растения, см	1	149.51±3.73	75-245	23.91
	2	134.96±3.79	22-194	30.74
	3	164.65±3.27	70-225	24.44
Число побегов, шт	1	1.43±0.08	1-4	51.98
	2	1.24±0.05	1-3	43.04
	3	1.72±0.08	1-5	59.22
Число прикорневых листьев, шт	1	5.24±0.38	1-19	66.44
	2	5.04±0.36	1-22	74.63
	3	6.84±0.45	1-27	79.18
Число нижних листьев, шт	1	3.60±0.19	1-12	50.14
	2	3.17±0.12	1-10	42.61
	3	4.60±0.22	2-15	58.84
Число срединных листьев, шт	1	10.70±0.72	4-42	64.28
	2	8.73±0.35	3-25	43.98
	3	13.09±0.68	3-50	63.55
Число соцветий особи, шт	1	21.68±1.38	5-69	60.92
	2	19.97±1.05	3-53	57.27
	3	37.65±2.29	4-161	74.59
Длина прикорневых листьев, см	1	84.98±3.45	16-174	35.34
	2	70.28±2.78	25-128	35.12
	3	95.60±2.16	37-150	25.14
Ширина прикорневых листьев, см	1	21.11±0.72	7-38.5	29.59
	2	19.85±0.72	5-33	32.03
	3	23.87±0.48	10-35	22.21
Длина срединных листьев, см	1	24.62±0.52	13-38.5	20.08
	2	25.96±0.56	11-38.5	23.69
	3	28.74±0.49	14-45	21.03
Ширина срединных листьев, см	1	11.33±0.27	6.5-22	22.48
	2	11.55±0.27	3-19	25.87
	3	14.05±0.38	5.2-29.5	33.34

Примечание: 1 – «южная группа» (местообитания Кугарчинского, Куюргазинского и Мелеузовского районов), 2 – выборки из западного макросклона южно-уральских гор (из Ишимбайского, Гафурийского, Архангельского и Бурзянского районов), 3 – местообитания из Башкирского Зауралья (из Баймакского района), $M \pm m$, *Lim* и *CV* – средняя и ее ошибка, пределы изменения признака и коэффициент вариации (%), соответственно.

Установлено, что различия растений из них статистически достоверны на высоком уровне.

Анализ природно-климатических условий Башкирского Зауралья позволяет предположить, что именно они благоприятствуют повышению продуктивности девясила высокого. Башкирское Зауралье выделяется засушливостью климата. Вид приурочен, главным образом, к лугам, где дефицит влаги не проявляется в качестве лимитирующего фактора даже в условиях данного региона. В этом случае сравнительно большое число солнечных дней в году, а также плодородие почв могут обеспечить, по сравнению с горно-лесной частью Южного Урала, большую продуктивность девясила высокого. Подтверждением этой гипотезы служит то, что южные местообитания (табл. 1) по показателям продуктивности уступающие зауральским выборкам, но превосходящие горно-лесные, по указанным двум экологическим факторам занимают промежуточное положение.

Таблица 2

Статистические параметры морфологических признаков в группах
Inula helenium L.

Параметры	Группы	$M \pm m$	<i>Lim</i>	<i>CV</i>	<i>p</i>
Высота растения, см	1	164.65±3.27	70-225	24.44	<0.001
	2	141.27±2.72	22-245	28.08	
Число побегов, шт	1	1.72±0.08	1-5	59.22	<0.001
	2	1.33±0.04	1-4	48.32	
Число прикорневых листьев, шт	1	6.84±0.45	1-27	79.18	0.003
	2	5.12±0.26	1-22	70.96	
Число нижних листьев, шт	1	4.60±0.22	2-15	58.84	<0.001
	2	3.35±0.11	1-12	46.92	
Число срединных листьев, шт	1	13.09±0.68	3-50	63.55	<0.001
	2	9.58±0.37	3-42	56.84	
Число соцветий особи, шт	1	37.65±2.29	4-161	74.59	<0.001
	2	20.71±0.84	3-69	59.07	
Длина прикорневых листьев, см	1	95.60±2.16	37-150	25.14	<0.001
	2	77.34±2.28	16-174	36.66	
Ширина прикорневых листьев, см	1	23.87±0.48	10-35	22.21	<0.001
	2	20.46±0.51	5-38.5	30.85	
Длина срединных листьев, см	1	28.74±0.49	14-45	21.03	<0.001
	2	25.38±0.39	11-38.5	22.40	
Ширина срединных листьев, см	1	14.05±0.38	5.2-29.5	33.34	<0.001
	2	11.45±0.19	3-22	24.45	

Библиографический список

1. Киньябулатов С.С. Девясил высокий (*Inula helenium* L.) на Южном Урале: популяционная структура и вопросы охраны: дисс. канд. биол. наук. – Пермь, 2010 – С. 94-105.
2. Редькина Н.Н., Муллагулов Р.Ю., Киньябулатов С.С., Янбаев Ю.А.

Популяционная структура девясила высокого на Южном Урале // Аграрная наука. – 2008. - №8 – С. 18-20.

3. Редькина Н.Н., Муллагулов Р.Ю., Янбаев Ю.А., Киньябулатов С.С. Обоснование принципов сохранения популяционного разнообразия девясила высокого на основе изоферментного анализа // Башкирский экологический вестник. – 2008. - № 1. – С. 36-38.

4. Редькина Н.Н., Киньябулатов С.С., Янбаев Ю.А., Муллагулов Р.Ю. О необходимости популяционного подхода при введении дикорастущих растений в культуру // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. - № 6 (100). – С. 308-309.

5. Байрамгулов Н.Р. Генетическая структура популяций родиолы ирмельской (*Rhodiola iredelica* Boriss.) на Южном Урале: автореф. дис... канд. биол. наук. – Уфа, 2004 – 20 с.

6. Ахмедова С.Р., Редькина Н.Н. Изменчивость содержания тяжелых металлов в лекарственных растениях в условиях естественного геохимического загрязнения Башкирского Зауралья // Науч. доклады конф. «Неделя науки-2003» Сибайского института Башкирского государственного университета. - Ч. 1. – Сибай, 2004. – С. 93-95.

УДК 630.232

Колосовская Ю.Е., Матвеева Р.Н.

ФГБОУ ВПО СибГТУ, г. Красноярск

ИЗМЕНЧИВОСТЬ КЕДРОВЫХ СОСЕН НА АРХИВНОМ УЧАСТКЕ ДЕНДРАРИЯ СИБГТУ

Ключевые слова: *сосна кедровая сибирская; сосна кедровая корейская; географическое происхождение, архивный участок.*

Введение. Существенное значение при создании плантаций кедровых сосен является использование потомства отселектированных деревьев, отличающихся стволовой, экологической, семенной и пыльцевой продуктивностью. При создании плантаций семенной продуктивностью обращается внимание на репродуктивное развитие деревьев для смешения экземпляров, образующих наибольшее количество шишек и микростробилов [1-3,5-7].

Цели и задачи исследований. На архивном участке дендрария СибГТУ среди деревьев 46-53-летнего возраста разного географического происхождения отселектировать экземпляры быстрорастущие по диаметру ствола, экологические – по длине хвои, урожайные – по количеству шишек на дереве и их расположению на побеге, а также отличающиеся повышенной пыльцевой продуктивностью для дальнейшего их размножения вегетативным путем и создания плантаций целевого назначения.

Материалы и методы исследований. Коллекция кедровых сосен разного географического происхождения на архивном участке дендрария СибГТУ

формируется с 1981 года. В настоящее время коллекция представляет семенное потомство 17 популяций сосны кедровой сибирской и одной популяции сосны кедровой корейской.

Маточные популяции произрастали на территории лесхозов (леспромхозов) Красноярского края (Северо-Енисейский, Ермаковский, Козульский, Бирилюсский, учебно-опытный СибГТУ); областей: Читинской (Красно-Чикойский), Свердловской (Верхотурский), Тюменской (Кондинский), Томской (Томский), Кемеровской (Мариинский и Тисульский); республик: Коми (Троицко-Печерский), Хакасии (Таштыпский, Бирикчульский), Тывы (Туранский), Якутии (Ленский), Бурятии (Селенгинский). Семена сосны кедровой корейской были получены из Вакского лесхоза Приморского края.

Маточные плантации произрастают от 62°50'с.ш. и 56°30'в.д. (Троицко-Печерский) до 46°51'с.ш. и 134°12'в.д. (Вакский). Высота над уровнем моря варьировала от 100 (С-Енисейский, Томский) до 1000-1500 м над уровнем моря (Селенгинский, Таштыпский). Архивный участок дендрария имеет координаты 56°00'с.ш. и 92°30'в.д., высота над уровнем моря составляет 300 м. Различаются маточные коллекции и по таксационным показателям. Класс бонитета варьирует от III (Ермаковский, Верхотурский, Таштыпский, Бирикчульский, Кондинский, учебно-опытный СибГТУ) до V (Троицко-печерский, Вакский). Класс возраста – от III (Таштыпский, Кондинский) до VII (Красно-Чикойский). Биологический возраст потомств разных популяций составляет 46-53 года. Сосна кедровая корейская представлена деревьями 51-летнего возраста.

Для отбора лучших экземпляров были использованы общепринятые в селекции методы. При селекционной оценке каждого дерева измерены диаметр ствола на высоте 1,3 м, длина хвои на текущем побеге боковой ветки, расположенной на южной стороне дерева, определено количество шишек, микростробиллов, их расположение на побеге. Экспериментальный материал обработан статистически [4].

Результаты исследований. Потомства разных популяций, произрастая в условиях дендрария СибГТУ, отличаются по диаметру ствола в зависимости от биологического возраста и видовой принадлежности (таблица 1).

Таблица 1 Возрастная и межвидовая изменчивость кедровых сосен по диаметру ствола

Возраст, лет	$X_{cp.}$	$\pm m$	$\pm \sigma$	V, %	P, %	t_{ϕ} при $t_{05}=2,02$
сосна кедровая сибирская						
46-48	21,8	1,33	4,61	20,2	6,1	1,95
49-50	22,2	0,77	3,59	16,2	3,5	1,79
51-52	24,7	1,13	5,88	23,8	4,6	-
53	23,1	0,57	3,32	14,4	2,5	1,19
сосна кедровая корейская						
51	21,6	1,37	3,63	16,8	6,3	2,08

Из приведенных данных видно, что уровень изменчивости диаметра ствола в основном средний. Диаметр ствола у сосны кедровой сибирской в возрастном периоде 46-53 года не имеет достоверных различий ($t_{\phi} < t_{05}$). Сосна кедровая корейская имеет меньший диаметр в сравнении с сосной кедровой сибирской того же биологического возраста.

Изменчивость сосны кедровой сибирской по длине хвои отражена в таблице 2.

Таблица 2 Возрастная и межвидовая изменчивость кедровых сосен по длине хвои

Возраст, лет	$X_{\text{ср.}}$	$\pm m$	$\pm \sigma$	V, %	P, %	t_{ϕ} при $t_{05}=2,02$
сосна кедровая сибирская						
46-48	10,6	0,33	1,20	11,3	3,1	1,10
49-50	11,6	0,21	0,97	8,4	1,8	0,00
51-52	11,2	0,17	0,90	8,0	1,5	0,49
53	10,7	0,17	0,98	9,2	1,6	1,11
сосна кедровая корейская						
51	11,6	0,50	1,33	11,5	4,4	-

Уровень изменчивости длины хвои по С.А. Мамаеву низкий (менее 12%). Средние показатели диаметра ствола и длины хвои по вариантам опыта приведены на рисунке 1.

В потомстве популяций были отселектированы деревья, превышение которых по диаметру или длине хвои составило 10% и более (таблица 3).

Наибольший диаметр ствола имеют деревья 71-1 – потомство Туранского лесхоза, в 51-летнем возрасте, 63-3 – Якутского лесхоза в возрасте 46 лет. Максимальная длина хвои была у деревьев 63-4, 61-2, 65-2 сосны кедровой сибирской и 59-3 сосны кедровой корейской.

В 2012 г. шишки образовались на 75,9% деревьев сосны кедровой сибирской и 28,6% сосны кедровой корейской. Отселектированные деревья по наибольшему количеству шишек на дереве и на побеге «в пучке» отражены в таблице 4.

Отселектированные деревья сосны кедровой сибирской по максимальному образованию шишек являются семенным потомством маточных популяций, произрастающих в пределах 53°30'г- 61° с.ш. разброс по долготе составляет 61°-94°12'г в.д. Особый интерес для селекционных исследований представляют многошишечные формы, к которым относятся деревья 75-1, 64-3 и 77-6, образовавшие по 4-5 шт. шишек на побеге. Сосна кедровая корейская отличалась меньшей урожайностью в 2012г.

Наблюдается большая изменчивость по формированию мужского яруса на деревьях кедровых сосен. Количество микростробиллов на дереве колебалось от 0 до 594 шт. В таблице 5 приведены отселектированные деревья по наибольшему образованию микростробиллов.

Микростробилы образовались на 87,5 % деревьев сосны кедровой сибирской и на 14,3 % сосны кедровой корейской.

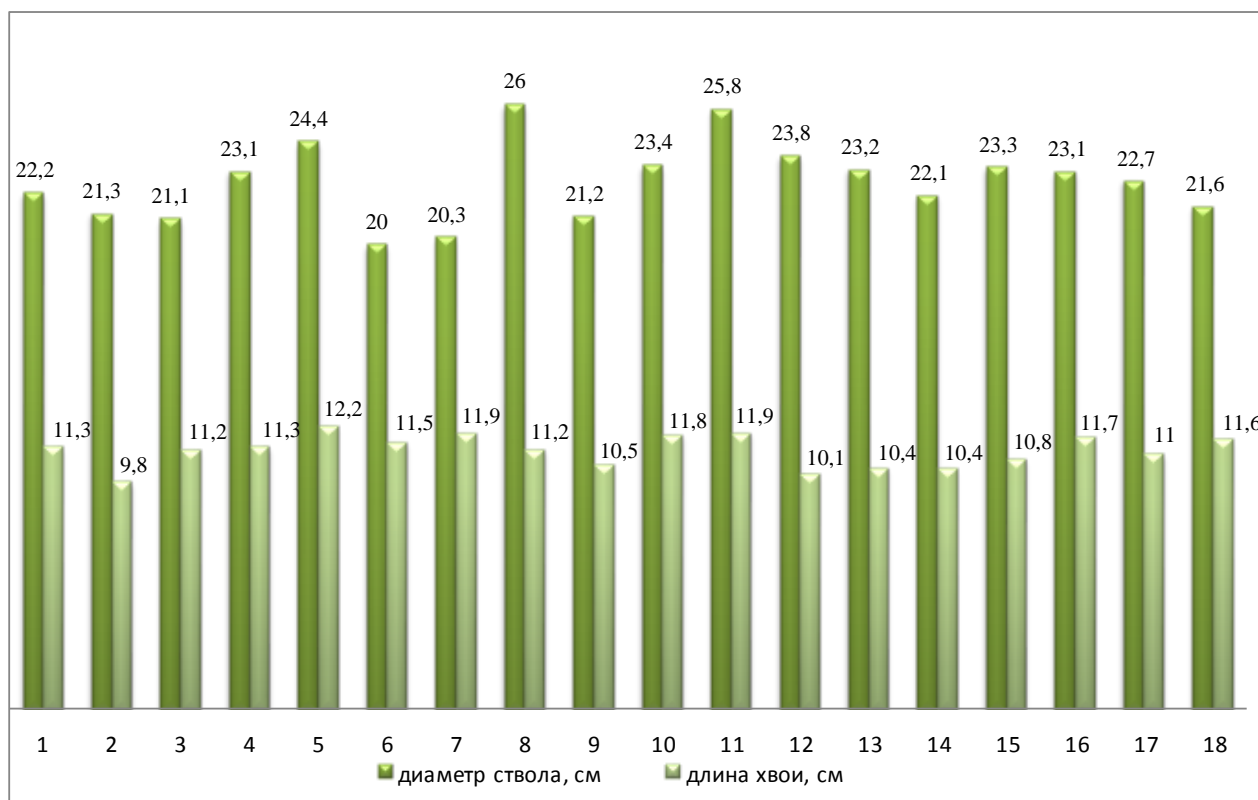


Рисунок 1 – Диаметр ствола и длина хвои у деревьев опытных вариантов: 1- Якутское происхождение (Ленский лесхоз), возраст 46 лет; 2- Северо-Енисейское (С-Енисейский л-з), 48 лет; 3- Аскизское (Бирикчульский л-з), 49 лет; 4-Таштыпское (Таштыпский ЛПХ), 49 лет; 5- Тисульское (Тисульский л-з), 49 лет; 6- Бирилюское (Бирилюский л-з), 50 лет; 7- Козульское (Козульский л-з), 50 лет; 8- Томское (Томский л-з), 50 лет; 9- Тувинское (Туранский л-з), 51 год; 10- Бирюсинское (учебно-опытный СибГТУ), 51 год; 11- Кемеровское (Мариинский л-з), 51 год; 12- Читинское (Красно-Чикойский л-з), 53 года; 13- Ермаковское (Ермаковский л-з), 53 года; 14- Коми (Троицко-Печерский л-з), 53 года; 15- Свердловское (Верхотурский л-з), 53 года; 16- Бурятское (Селенгинский л-з), 53 года; 17- Тюменское (Кондинский л-з), 53 года; 18- Приморское (Вакский л-з), 51 год.

Выводы. В результате проведенных исследований было установлено, что географическое происхождение, в большей степени оказывает влияние на интенсивность роста и репродуктивное развитие, чем биологический возраст в пределах 46-53 года. Сосна кедровая корейская в 51- летнем биологическом возрасте отстает от сосны кедровой сибирской по диаметру ствола, образованию шишек и микростробилов, но превосходит по длине хвои. Отселектированные деревья среди потомств кедровых сосен рекомендуются в первую очередь для вегетативного размножения и пополнения существующей клоновой коллекции.

Таблица 3 – Отселектированные деревья по диаметру ствола и длине хвои

Номер варианта (наименование предприятия)	Биологический возраст, лет	Номер деревя	Диаметр ствола		Длина хвои	
			см	% X _{ср.} к	см	% X _{ср.} к
Сосна кедровая сибирская						
1 (Ленский)	46	63-3	30,4	136,3	11,9	105,3
		63-5	25,8	116,2	11,4	100,1
		63-4	24,0	108,1	12,7	112,4
2 (С-Енисейский)	48	79-2	28,7	134,7	10,3	105,1
		79-1	21,7	101,9	11,3	115,3
3 (Бирикчульский)	49	69-1	29,6	140,3	11,9	106,2
5 (Тисульский)	49	60-3	28,2	115,6	12,8	104,9
		60-1	27,9	114,3	11,5	94,3
6 (Бириллюсский)	50	62-2	24,5	122,5	12,2	106,1
9 (Туранский)	51	71-1	34,8	133,2	11,6	110,5
10 (учебно-опытный СибГТУ)	51	67-1	29,1	118,3	10,3	100,0
		67-2	25,0	101,6	11,9	115,5
11 (Мариинский)	51	61-1	29,6	114,7	12,7	106,7
		61-2	23,6	91,5	13,1	110,1
12 (Красно-Чикойский)	53	78-7	28,4	119,3	10,1	100,0
		78-3	26,8	112,6	10,5	104,0
		78-5	22,6	95,0	11,6	114,9
13 (Ермаковский)	53	77-1	26,8	115,5	10,5	101,0
		77-6	26,5	114,2	10,8	103,8
		77-4	22,5	97,0	11,9	114,4
14 (Троицко- Печерский)	53	76-1	24,3	110,0	10,2	98,1
15 (Верхотурский)	53	75-2	28,5	122,3	12,5	115,7
		75-6	23,3	112,9	11,8	109,3
16 (Селенгинский)	53	74-3	27,6	119,5	12,0	102,6
		74-5	26,8	116,0	11,4	97,4
17 (Кондинский)	53	65-2	27,5	121,1	13,3	120,9
Сосна кедровая корейская						
18 (Вакский)	51	59-1	26,7	123,6	12,1	104,3
		59-3	22,5	104,2	13,3	114,7

Таблица 4 - Отселектированные деревья по образованию шишек

Номер варианта (наименование предприятия)	Биологический возраст, лет	Номер дерева	Количество шишек			
			на дереве		на побеге («в пучке»)	
			шт.	% к $X_{ср.}$	шт.	% к $X_{ср.}$
сосна кедровая сибирская						
2 (С-Енисейский)	48	80-4	14	264,2	3	157,9
7 (Козульский)	50	56-1	10	188,7	2	105,3
8 (Томский)	50	64-3	12	226,4	4	210,5
10 (учебно- опытный СибГТУ)	51	68-2	10	188,7	3	157,9
11 (Мариинский)	51	61-4	10	188,7	2	105,3
13 (Ермаковский)	53	77-6	10	188,7	5	263,2
15 (Верхотурский)	53	75-1	36	679,2	4	210,5
		75-5	16	301,9	3	157,9
		75-7	16	301,9	3	157,9
Среднее значение			5,3	100,0	1,9	100,0
сосна кедровая корейская						
18 (Вакский)	51	59-1	5	125,0	3	100,0
Среднее значение			4,0	100,0	3,0	100,0

Библиографический список

1. Горошкевич, С.Н. Репродуктивная дифференциация популяций и принципы отбора кедровых сосен на семенную продуктивность / С.Н. Горошкевич // Кедровошироколистные леса Дальнего Востока. – Хабаровск, 1996. – С. 85-86.
2. Земляной, А.И. Методика отбора плюсовых деревьев кедра сибирского по семенной продуктивности / А.И. Земляной, Т.П. Некрасова. – М.: Гослесхоз, 1980.- 22с.
3. Кузнецова, Г.В. Изменчивость формирования микростробилов у клонов кедра сибирского разного происхождения / Г.В. Кузнецова // Актуальные проблемы генетики.- М.,2003.- Т.1.- С.116-117.
4. Кузьмичев, В.В. Математическая статистика / В.В. Кузьмичев, Н.В. Павлов, А.С. Смольянов.- Красноярск: СТИ, 1994.- 80с.
5. Матвеева, Р.Н. Коллекция кедровых сосен разного географического происхождения на опытных участках СибГТУ/ Р.Н. Матвеева, О.Ф. Буторова. Красноярск: СибГТУ, 2007. - 68с.
6. Матвеева Р.Н. Характеристика семенного потомства плюсовых деревьев кедра сибирского на плантации Западно-Саянского опытного лесного хозяйства / Р.Н. Матвеева, О.Ф. Буторова, В.С. Филимохин // Хвойные бореальной зоны, том XXX, номер 1-2.- Красноярск, 2012.- С.120-126.

Таблица 5 – Отселектированные экземпляры сосны кедровой сибирской по образованию микростробилов на деревьях

Номер варианта (наименование предприятия)	Биологический возраст, лет	Номер дерева	Количество боковых побегов с микростробилами, шт.	Количество микростробилов шт.			
				на ветви		на дереве	% к X _{ср.}
				max	min		
2 (С-Енисейский)	48	79-1	28	22	7	406	379,4
		80-4	36	16	4	360	336,4
3 (Бирикчульский)	49	69-1	24	12	8	240	224,3
4 (Таштыпский)	49	73-1	22	18	3	231	215,9
5 (Тисульский)	49	60-1	15	24	7	165	154,2
9 (Туранский)	51	72-3	20	20	8	280	261,7
10 (учебно- опытный СибГТУ)	51	68-2	32	16	7	368	343,9
		58-5	30	20	8	420	392,5
		58-6	23	12	9	241	225,7
		58-2	14	16	8	207	187,0
		58-4	11	25	5	165	154,2
11 (Мариинский)	51	61-2	22	40	14	594	555,1
12 (Красно- Чикойский)	53	78-1	30	11	5	240	224,3
		78-2	36	25	4	522	487,9
		78-7	16	27	6	264	246,7
15 (Верхотурский)	53	75-1	38	18	11	551	515,5
16 (Селенгинский)	53	74-2	15	28	4	240	214,3
		74-5	17	20	4	204	190,7
Среднее значение						106,8	100,0

7. Титов, Е.В. Плантационное лесовыращивание кедровых сосен / Е.В. Титов.- Воронеж: ВГЛТА, 2004.- 165с.

Музафарова А.А., Галеев Э. И.
ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, г. Уфа

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ В ТЕХНОГЕННЫХ ЗОНАХ

Ключевые слова: генетическая структура; электрофоретический анализ; береза повислая.

Способность березы повислой к распространению пыльцы и семян на дальние расстояния формирует состав генотипов у самосева так, что при лесовозобновлении новых территорий может быть представлен весь генофонд

близлежащих естественных популяций. В этом случае, пространственная структурированность генотипов не должна быть выраженной. Однако при естественном лесовозобновлении часто можно наблюдать разновозрастный подрост, а часть деревьев находится в репродуктивном возрасте и может служить источником обсеменения. Распространение генотипов в этом случае носит неслучайный характер. Изучение данного процесса позволит определить, насколько можно рассчитывать на естественное возобновление отвалов и как при этом формируется генофонд популяций на техногенных землях. Пространственное распределение генотипов исследовано с использованием автокорреляционного анализа, основанной на GIS-технологиях (Degen, Scholz, 1998). Большинство исследователей при этом используют в качестве маркеров изоферменты (Geburek, 1993).

Представленные в работе результаты основаны на данных пробной площади, заложенной на промышленных отвалах Башкирского медно-серного комбината (г.Сибай). Березы на данном участке (149 особей) были картированы с использованием угло- и длиномерной съемки. Образцы характеризовались с помощью изоферментов. Разделение их проводили методом диск-электрофореза в вертикальных пластинах 7.5 %-ного полиакриламидного геля с рН разделяющего геля 8.9 (Davis, 1964; Ornstein, 1964). После электрофореза по стандартным методикам проводился гистохимический анализ зон ферментативной активности. (Корочкин и др., 1977) с некоторыми изменениями. Применены изоферменты 6 полиморфных локусов (Aap-2, Aap-1, Est-4, Est-3, Est-1, NADHdh-1) аланинаминопептидазы (AAP), неспецифических эстераз (EST) и НАДНдегидрогеназы (NADHDH, 1.6.4.3).

Компьютерная программа Spatial Genetic Software SGS (Visual Basic V. 5.0) использована для автокорреляционного анализа. Статистическая оценка степени пространственной структурированности генетической изменчивости оценивалась по индексу Морана I (Sokal, Wartenberg, 1983). Достоверность гетерогенности оценивали с помощью теста для определения отклонения фактического пространственного распределения генотипов от их случайного размещения. Все параметры вычислялись для пар “точек” (особей, генотипов), принадлежащих к различным сериям классов дистанций. Результаты вычислений преобразовывали в корелограммы. Большие значения свидетельствовали о положительной, а меньшие – об отрицательной автокорреляции генотипов. При вычислениях использовали аллели с частотой 0.05 и выше.

Таким образом, автокорреляционный анализ шести полиморфных локусов показал, что с расстояния 184 м структурированность становится закономерной, а «генетическое родство» деревьев, флуктуируя в начале случайным образом, статистически значимо уменьшается с увеличением дистанции. Индекс Морана в этом классе убывал со значения 0.019 до -0.007 (это изменение было достоверно на уровне $P = 0.042$, выйдя за пределы 95 %-ного доверительного интервала). При естественном лесовозобновлении промышленных отвалов распределение аллелей в двумерном пространстве носит неслучайный характер.

Два из шести использованных локусов позволили выявить существование неслучайного пространственного распределения генетической изменчивости. Изменения значений индекса Морана по локусу Est-1 практически повторяют картину, полученную одновременно по всем локусам. Начиная также с расстояния 184 м, где индекс выходит за пределы 95 %-ного доверительного интервала, его значение убывает с уровня 0.055 до -0.052. Более кардинальные изменения индекса Морана (носящие «волнообразный характер») показывает локус Aar-2 (таблица). Отмечены 3 случая выхода его за пределы 95 %-ного доверительного интервала и 2 случая «подхода» к этому порогу.

В контексте результатов исследования, можно утверждать, что при естественном лесовозобновлении промышленных отвалов распространенность аллелей и генетической изменчивости носит неслучайный характер. Это нехарактерно для березы повислой с ее способностью распространять семена на дальние расстояния. Трудно представить, что при распределении семян из небольших насаждений (отстоящих от отвалов комбината на расстояниях более 2 км), наблюдался бы «материнский эффект».

Из-за отсутствия почвы, неблагоприятных аэро- и гидрологических режимов грунта, его крупнообломочного механического состава и подвижности, сильной фитотоксичности отдельных участков в

Таблица Изменения индекса Морана по локусу Aar-2 по классам дистанций

Классы дистанций, м	Значения индекса	Доверительный интервал	
		< 0.95	> 0.95
0-23	-0.007	0.466	0.534
23.1-46	-0.042	0.962*	0.038*
46.1-69	0.030	0.056	0.944
92.1-115	-0.032	0.840	0.160
115.1-138	0.059	0.010**	0.990**
138.1-161	-0.049	0.948	0.052
161.1-184	-0.004	0.470	0.530
184.1-207	0.060	0.032*	0.968*
207.1-230	-0.064	0.900	0.100

Примечание: * и ** - достоверно на уровнях $P < 0.05$ и $P < 0.01$.

первые годы создания отвалов из нанесенных семян (пусть даже при обильном заносе) отдельные и редко расположенные экземпляры подроста могут появиться лишь на относительно выровненных элементах рельефа, отличающихся от условий отвала в целом. Это, видимо, дренированные переувлажненные местообитания с мелкоземом. С вхождением в репродуктивный возраст и началом почвообразовательного процесса эти деревья могут стать источником собственных семян отвалов, одновременно с продолжающимся поступлением семян из близлежащих насаждений. Конечно, опыление

деревьев-источников семян может происходить и из близлежащих насаждений, но неслучайное распределение в двумерном пространстве может быть показано и при помощи материнских аллелей.

Выявлено, что число подроста резко возрастает с уменьшением возраста, несмотря на то, что скорее всего поступление семян на отвалы из близлежащих насаждений, видимо, по годам относительно стабильно. Так же это подтверждается по измеренным нами параметрам (диаметры у корневой шейки и на высоте груди, высота подроста, длина кроны). В исследованной выборке отмечены относительно частые случаи нарушения правила Харди-Вайнберга. В целом, как это показано для 17 природных Южного Урала (Коновалов и др., 2003), у березы повислой это чрезвычайно редкое явление. Статистически значимые отклонения выявлены лишь в двух насаждениях. В исследованной этими авторами близлежащей Баймакской популяции различия наблюдаемых и ожидаемых частот генотипов не были выявлены. Если в этой работе показано, что нарушения правила Харди-Вайнберга происходили из-за достоверного эксцесса гетерозигот, в изученной нами пробной площади, наоборот, наблюдался дефицит гетерозиготности. Одной из основных причин этих нарушений считают ограниченное число особей, которые участвуют в скрещивании и неравный вклад отдельных особей в образование потомства (Животовский, 1991). Это и доказывается в предложенном сценарии первоначального возобновления отвалов.

Одним из основных способов рекультивации нарушенных земель, является искусственная лесная рекультивация. К сожалению, таких работ практически нет по ряду причин, экономических и технологических. Результаты нашего исследования показывают механизм естественного зарощения отвалов древесными растениями, который можно использовать при искусственном возобновлении отвалов.

Библиографический список

1. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. - М.: Наука, 1991. - 271 с.
2. Коновалов В.Ф., Янбаев Ю.А., Чурагулова З.С., Галеев Э.И. Популяционная структура и сохранение генофонда березы повислой на Южном Урале // Уфа: БГАУ, 2003. – 260 с.
3. Davis B.J. Disc electrophoresis. 11. Methods and application to human serum proteins //Ann. New York Acad. Sci. - 1964. - V. 121. - P. 404-427.
4. Degen B., Scholz F. Spatial genetic differentiation among populations of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in Western Germany as identified by geostatistical analysis //Forest Genetic. - 1998. – №. 5(3). - P.191-199.
5. Geburek T. Are Genes Romly Distributed Over Space in Mature Populations of Sugar Maple (*Acer saccharum* Marsh.) //Annals of Botany. – 1993. – V. 71. - P. 217-222.
6. Ornstein L. Disc-electrophoresis. I. Background and theory //Ann. New York Acad. Sci. - 1964. - V. 121. - P. 321-349.

7. Sokal R.R., Wartenberg D.E. A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model //Genetics. – 1983. - V. 105. - P. 219-237.

УДК 630*17: 582.632.1

Музафарова А.А.¹, Кулагин А.А.², Гасымов Р.Т.¹

¹ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, г. Уфа

²Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа.

РАЗЛИЧНАЯ ПОПУЛЯЦИОННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПОДРОСТА ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ В РАЗНЫХ ТЕХНОГЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Ключевые слова: береза повислая, лесная рекультивация, генетическая изменчивость

В Башкирском Зауралье из-за длительной разработки рудных полезных ископаемых образовались значительные по площади нарушенные земли. В настоящее время на отвалах и хвостохранилищах происходит естественное лесовозобновление. Однако насколько изменяется при этом генофонд природных популяций? Его деградация может привести к уменьшению способности растений к адаптации в изменяющихся условиях среды.

В районе отвалов Башкирского медно-серного (БМСК) и Учалинского горно-обогатительного (УГОК) комбинатов в 26 выборках подроста сосны обыкновенной и березы повислой (всего 950 особей, средний объем выборки – 37) были взяты растительные образцы для электрофоретического анализа генетических маркеров - изоферментов. Методика исследований была приведена ранее (Музафарова, 2006).

У подроста сосны обыкновенной в районе Учалинского ГОК (как на отвалах, так и под пологом леса) выявлен относительно слабый уровень межвыборочных различий по частотам аллелей и показателям генетического разнообразия. По этой причине доля генетической изменчивости, приходящаяся на межвыборочную изменчивость, составила всего $F_{st} = 3.8 \%$ - внутривыборочная подразделенность доминировала (96.2 %). В среднем на один локус выявлено 1.9-3.1 аллелей, средняя по 10 полиморфным локусам наблюдаемая гетерозиготность (H_o) изменялась от 0.203 до 0.277, ожидаемая (H_e) – от 0.201 до 0.275. Несмотря на кажущиеся относительно высокие различия выборок, при введении критерия полиморфности 0.95 показатели выравниваются. Слабую дифференциацию показывает и генетическое расстояние Нея ($D = 0.011$). По использованным параметрам генетического разнообразия не выявлены существенные отличия выборок подроста отвалов УГОК от ближайшего массива соснового леса ($A = 2.2$, $H_e = 0.277$, $H_o = 0.203$), а также подроста на отвалах БМСК (в единственной имеющейся выборке $A = 2.1$, $H_e = 0.230$, $H_o = 0.231$). В целом, во всех группах соблюдается правило Харди Вайнберга.

В зоне деятельности УГОК обнаружен низкий уровень межвыборочной дифференциации у березы повислой. У двух выборок подроста на отвалах и

близлежащего насаждения выявлена подразделенность $F_{st} = 0.012$. В среднем для трех попарных сравнений генетическое расстояние $D = 0.018$, различия частот аллелей статистически недостоверны ($P = 0.360$), H_e изменяется в пределах 0.498-0.517, H_o – 0.432-0.630. Во всех выборках соблюдается правило Харди-Вайнберга. Частоты аллелей выборок близки к их частотам популяций природных популяций.

Другая картина пространственного распределения генетического разнообразия локуса обнаружена на техногенной зоне БМСК. Частота основного аллеля локуса *NADdh-1*, например, изменяется от 0.438 до 0.844, H_o и H_e – от 0.250 до 0.690 и от 0.272 до 0.500, соответственно. Гетерогенность частот аллелей статистически достоверна на $P < 0.001$. Параметр межвыборочной подразделенности составил $F_{st} = 0.062$, т.е. более чем в 5 раз выше, чем вблизи УГОК. Среднее по парам генетическое расстояние также выше в несколько раз ($D = 0.052$). И, наконец, у 3 из 9 выборок отмечены случаи достоверного нарушения правила Харди-Вайнберга на уровне значимости $P < 0.05$ (в 30 % из 9 теоретически возможных случаев). На дендрограмме выделяются 3 группы пробных площадей, четко различающиеся по расположению по сторонам отвалов. Пять из них представляют собой группы подростка северной части отвалов БМСК. Максимальный уровень генетических различий между ними по частотам аллелей – $D = 0.004$. Другая группа трех выборок расположена на западной, наиболее «старой», части отвалов. Дифференциация по частотам аллелей в их пределах также выражена в небольшой степени. Генетическое расстояние между двумя группами выше внутрigrупповых различий почти в 13 раз ($D = 0.051$). Выборка из южной части отвалов (это зона практически без всякой растительности, здесь редкие экземпляры березы повислой разбросаны по экспозиции) отличается от первых двух групп на уровне $D = 0.136$.

Таким образом, на техногенных землях двух комбинатов выявлена различная пространственная структурированность генетического разнообразия.

В районе УГОК генетическая структура подростка сосны обыкновенной и березы повислой на отвалах близка к генетическому составу деревьев близлежащих насаждений, генофонд природных популяций воспроизводится в достаточной степени. Видимо, причиной этой закономерности выступает то, что по всему периметру отвалов к ним вплотную подступают естественные древостои, являющиеся источником стабильного и обильного поступления семян.

В степной зоне (БМСК) установлена высокая генетическая дифференциация в пространстве выборок подростка березы повислой. Вероятной причиной этого феномена может быть дефицит семян, необходимых для воспроизводства генофонда природных популяций на промышленных землях. Здесь потенциальные источники поступления семян представлены лишь отдельными деревьями прилегающей территории, а немногочисленные березовые колки находятся на значительном удалении от комбината. На основе этого, а также генетических результатов, нами предлагается следующая картина лесовозобновления отвалов БМСК. Из-за трудности лесовозобновления в

начальный период после создания отвалов отдельные и редко расположенные экземпляры подроста могут появиться лишь в относительно благоприятных лесорастительных условиях. Со входом в репродуктивный возраст эти деревья могут стать источником собственных семян отвалов. Однако при этом проявляется «эффект основателя», из-за чего происходит локальная концентрация материнских аллелей отдельных генотипов, приводя к пространственной генетической подразделенности групп подроста. Можно привести косвенные аргументы для обоснования этого заключения. Во-первых, число подроста резко возрастает с уменьшением возраста. Например, в целом на отвалах 80 % подроста – в возрасте до 5 лет, а молодняк свыше 30 лет встречается единично. Во-вторых, в исследованных выборках березы повислой в районе БМСК отмечены частые случаи нарушения правила Харди-Вайнберга. Одной из причин такого явления обычно считается ограниченное число особей, участвующих в скрещивании, и неравный вклад отдельных особей в образование потомства.

Полученные нами данные, видимо, имеют и практическое значение. В районе УГОК воспроизводство генофонда природных популяций на отвалах позволяет оставлять их под естественное возобновление, не прибегая к экономически затратной искусственной рекультивации. В условиях БМСК во избежание дрейфа генов и инбридинга, теоретически ожидаемых в изолированных небольших группах особей, необходима посадка на отвалах деревьев (частичная лесная рекультивация), которые с достижением репродуктивного возраста могут стать источниками собственных семян отвалов или семенниками. Эта мера позволит повысить генетическое разнообразие «техногенных лесов» и приблизить его к генофонду природных популяций.

Библиографический список

Музафарова А.А. Генетическая дифференциация выборок древесных растений на отвалах горнодобывающих предприятий // Человек и Вселенная. – 2006. - № 6(59). – С. 34-39.

УДК 575.17

Муллагулов Р.Ю.

Зауральский филиал Башкирский ГАУ, г. Сибай

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РАСТЕНИЙ В ВЫБОРЕ ПРИНЦИПОВ ОХРАНЫ

Ключевые слова: редкие и исчезающие виды растений; генетическая и пространственная структура природных популяций; изоферментный анализ; уровни генетической изменчивости; сравнение редких и исчезающих растений с наиболее распространенными видами.

Введение.

Популяционно-видовой уровень сохранения биоразнообразия считается важнейшей при охране природы [1]. В естественных экосистемах, особенно подверженных воздействию хозяйственной деятельностью, нарушены механизмы саморегуляции генофонда популяций и его воспроизводства [2].

В Республике Башкортостан с развитой сетью особо охраняемых природных территорий (ООПТ), только около 60% редких и исчезающих видов растений обеспечено охраной [3].

Цель и задачи исследования. На рубеже столетий Республика Башкортостан характеризуется расширением всестороннего изучения редких и исчезающих видов растений. Исследованиями охвачено распространение, экология, фитоценология, популяционная биология, интродукция и реинтродукция [4], генетическая структура популяций. На основе изучения изоферментного состава растений разрабатывается дифференцированный подход в сохранении растений, отнесенных к категории редких и исчезающих видов, особенно на краю ареала, выделение местообитаний с уникальным генофондом, создание синтетических популяций на основе объединения генофондов растений разных местообитаний, переселение их в естественные местообитания с целью восстановления генетического разнообразия природных популяций.

Материалы и методы исследования.

Объектами исследования являлись редкие и исчезающие и широко распространенных видов растений. Генетическая и пространственная структура природных популяций редких и исчезающих видов растений, расположенных на границе естественного распространения (цмина песчаного *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, термопсиса Шишкина *Thermopsis schischkinii* Czefr. (*Thermopsis lanceolata* R.Br. non R.Br.), пиона уклоняющегося *Paeonia anomala* L. проанализирована на фоне анализа состояния популяций некоторых более широко распространенных видов в естественных местообитаниях, относительно слабо подверженных антропогенной нагрузке (вишни кустарниковой *Cerasus fruticosa* Pallas и девясила высокого *Inula helenium* L.).

Показатели генетической изменчивости видов изученной группы имеют невысокие значения, сопоставимые с данными, известными для редких и исчезающих видов растений, представленных несколькими изолированными популяциями. Учитывая нахождение вида на краю естественного ареала, в качестве одного из причин низкого уровня полиморфизма по изоферментам рассматриваются климатические условия, к которым адаптирована популяция [5].

На основе сравнения популяций растений по суммарному соотношению частот аллелей всех исследованных локусов сделан вывод об иерархичности популяционной системы. По результатам кластерного анализа на основе генетических расстояний Нея выявлена значительная дивергенция природных популяций всех изученных видов редких и исчезающих растений. Примеры

дендрограмм, показывающие значительную генетическую дивергенцию природных популяций некоторых изученных видов, приведены на рис.1-5.

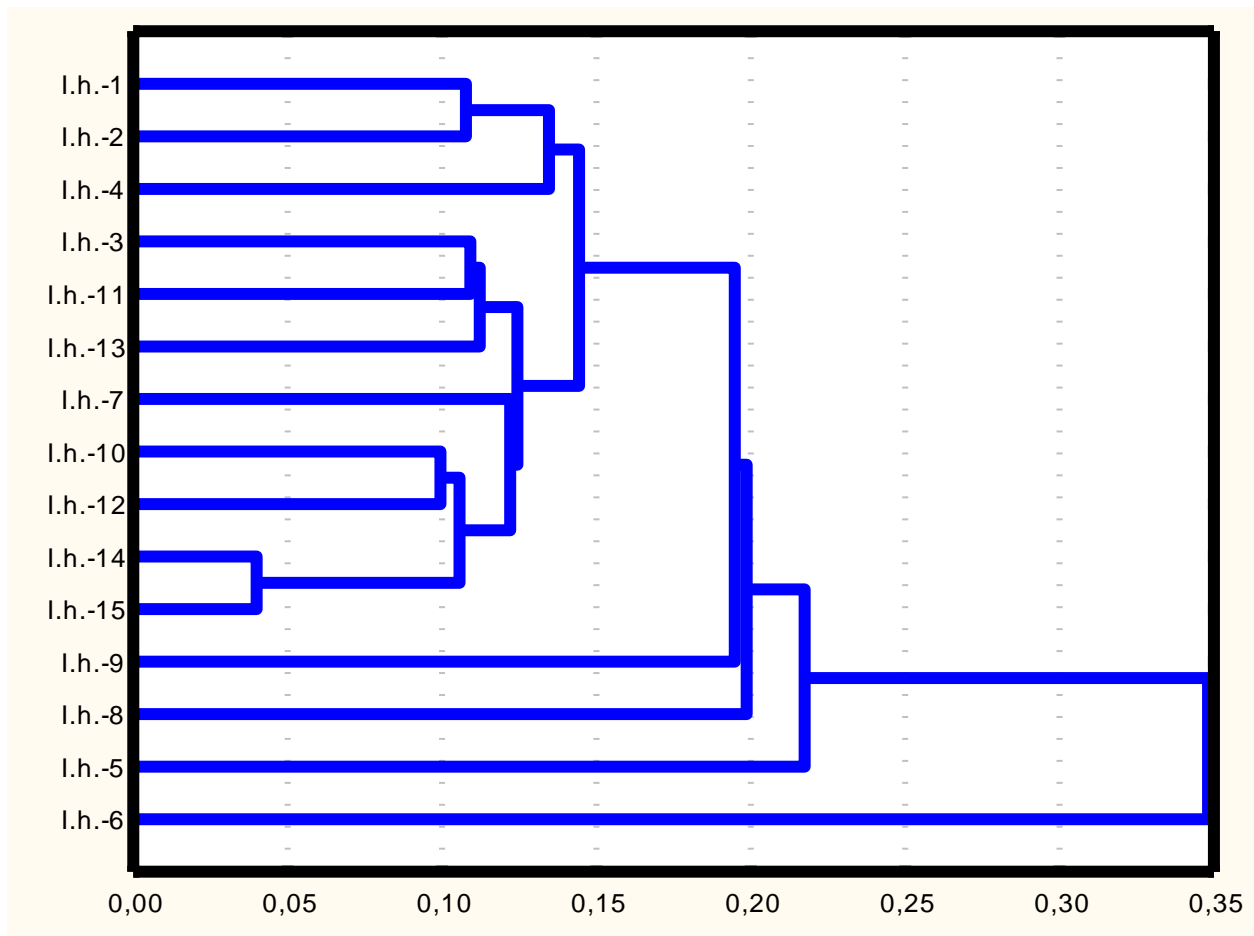


Рис.1. Дендрограмма на основе генетических расстояний D между популяциями девясила высокого

Наиболее генетически дивергировали крупные региональные популяции, сильно разобщенные пространственно. Так, у пиона уклоняющего *Paeonia anomala* L. – популяции из Зианчуринского и Бурзянского районов менее дивергированы ($D=0,022$) по сравнению с популяцией с северной части республики ($D=0,044$). Популяция цмина песчаного *Helichrysum arenarium* (L.) Moench с Зианчуринского района более разобщена ($D=0,045$) по сравнению с локальными близко расположенными популяциями с Баймакского района ($D=0,043$). Для популяций термопсиса Шишкина *Thermopsis schischkinii* Czefr. (*Thermopsis lanceolata* R.Br. non R.Br. выявлено также сильная дивергенция между популяциями окрестности озера Яугуль (Баймакский район) и озера Уляндыкуль (Абзелиловский район) ($D=0,045$), в то время как популяции в окрестностях озера Яугуль наименее дивергированы ($D=0,002$). Оказались наиболее дивергированными все изученные популяции вишни кустарниковой *Cerasus fruticosa* Pallas – генетические расстояния D имели значения от 0,030 до 0,226, причем наибольшие значения выявлены для сильно пространственно разобщенных популяций из Зауралья и Предуралья. Для девясила высокого *Inula helenium* L. также установлена сильная дивергенция – от 0,040 до 0,350.

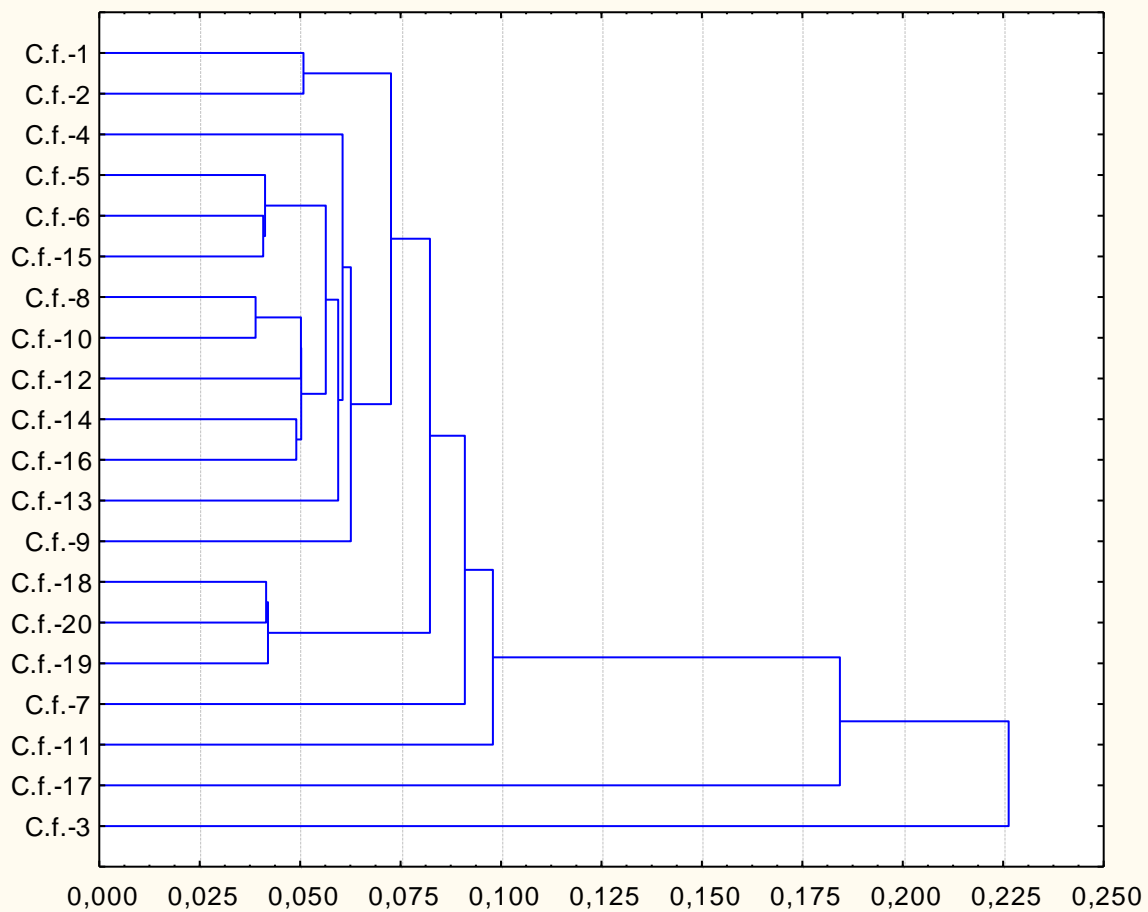


Рис.2. Дендрограмма на основе генетических расстояний D между популяциями вишни кустарниковой

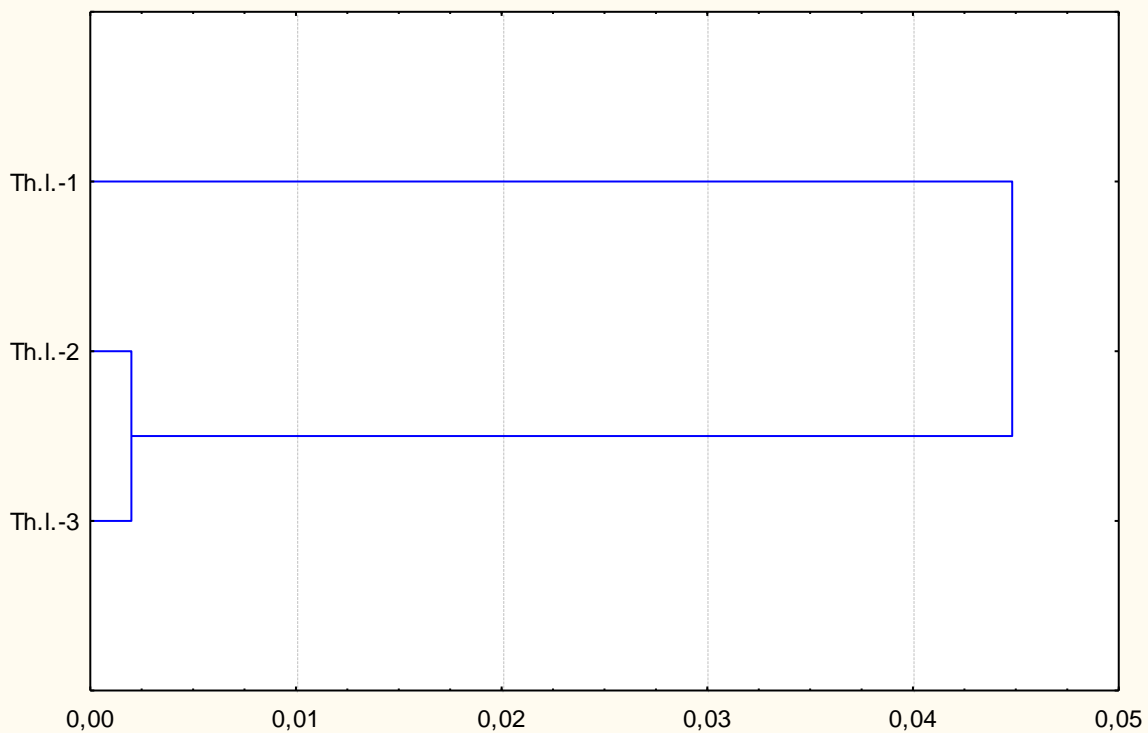


Рис.3. Дендрограмма на основе генетических расстояний D между популяциями термопсиса Шишкина

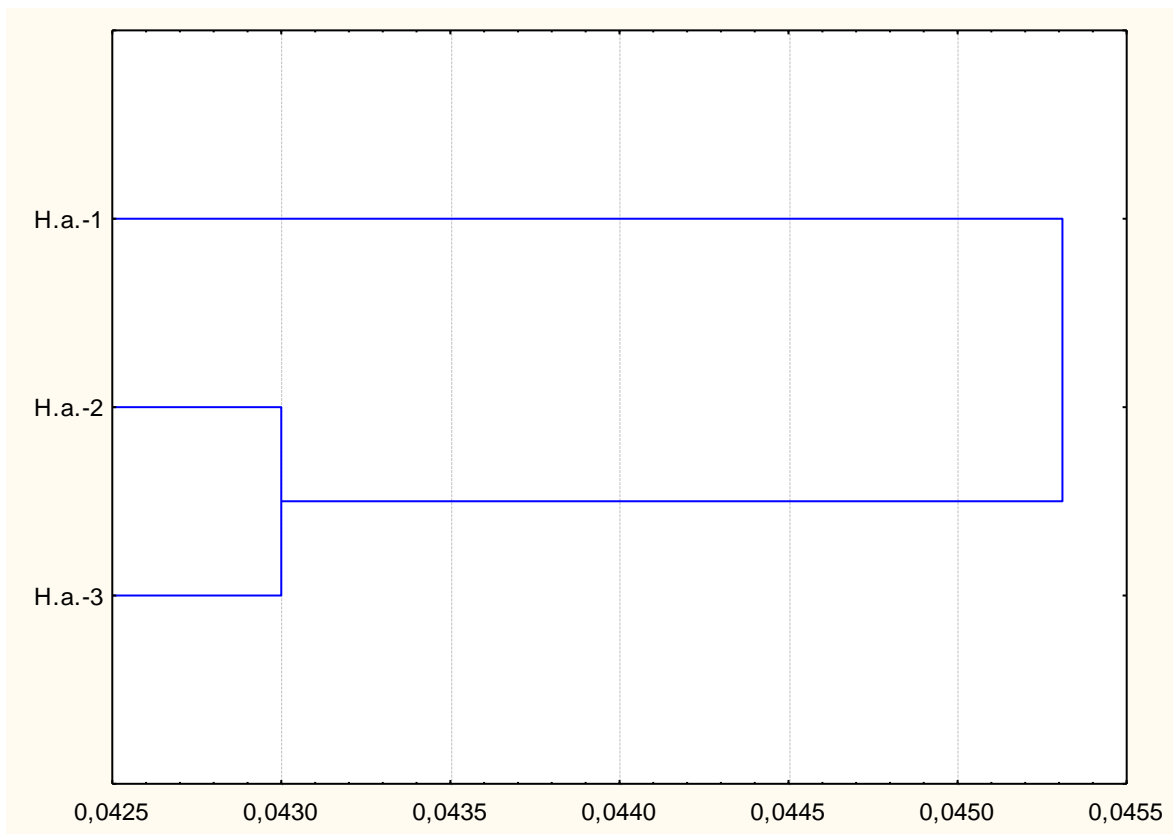


Рис.4. Дендрограмма на основе генетических расстояний D между популяциями цмина песчаного

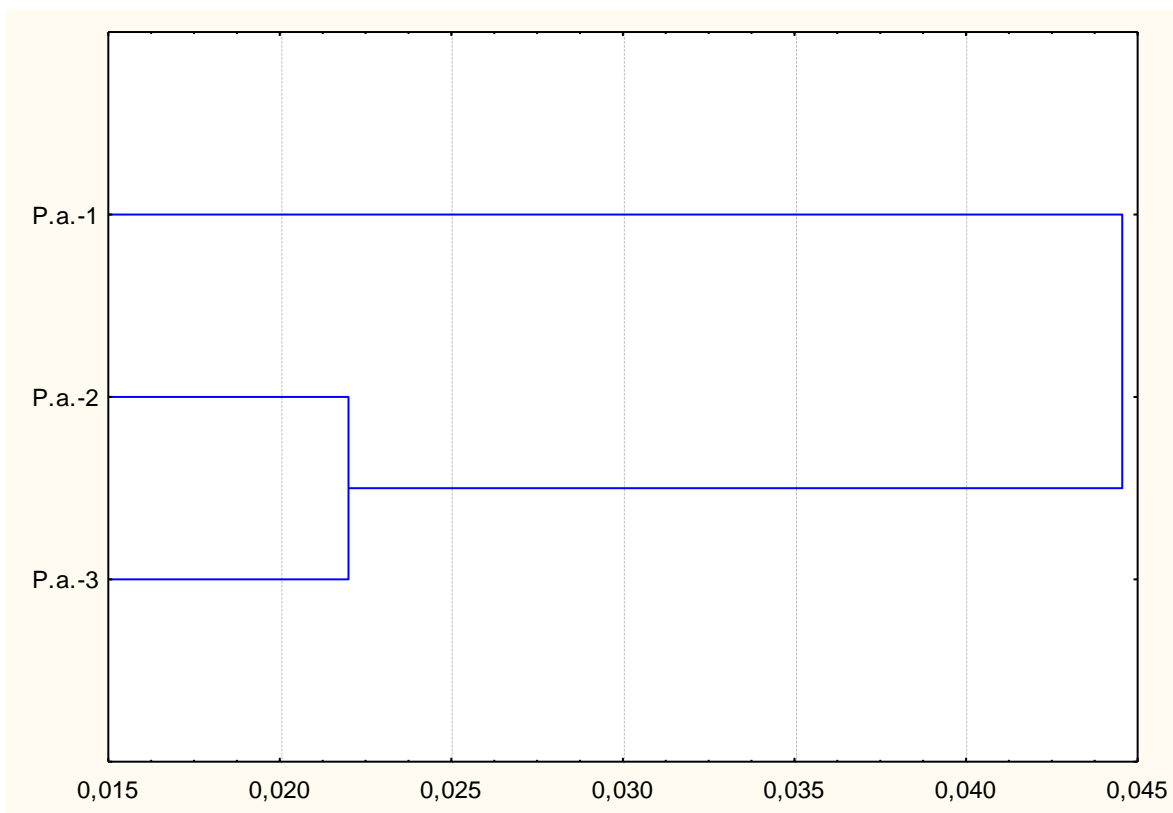


Рис.5. Дендрограмма на основе генетических расстояний D между популяциями пиона уклоняющего

Результаты сравнительного анализа показывают уязвимость популяций редких и исчезающих видов и дополнительно указывают на важность проведения генетического обследования для выбора конкретной формы их охраны.

Выводы. По результатам исследования популяционного разнообразия редких и исчезающих и широко распространенных видов растений Южного Урала выявлены разнонаправленные изменения их популяционной структуры, заключающиеся, в целом, в нарушениях иерархичности эволюционно сложившейся пространственно-популяционной структурированности. Установлено, что редкие и исчезающие виды растений характеризуются различной степенью развития этих неблагоприятных процессов, требующих дифференцированного подхода к их охране.

Библиографический список

1. Конвенция о биологическом разнообразии. Текст и приложения. NER/CBD/COP/8/12,2006. 38 с.

2. Макеева В.М., Белоконь М.М., Смуров А.В. Эколого-генетический подход к охране животных антропогенных экосистем. М.: Изд-во Московского университета, 2011. -160 с.

3. Мулдашев А.А., Миркин Б.М. Степи Башкортостана: защищенность и перспективы охраны флоры и растительности /Экологическая сеть, №20 зима-весна. 2006.

4. Мулдашев А.А., Абрамова Л.М., Шигапов З.Х., Мартыненко В.Б., Галева А.Х., Маслова Н.В. Приоритеты, методы и опыт реинтродукции редких видов растений в степной зоне республики Башкортостан // Принципы и способы сохранения биоразнообразия: Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 22-26 сентября 2010 г. Йошкар-Ола, 2010. С.41-44.

5. Муллагулов Р.Ю. Уровень генетической изменчивости разных видов растений Южного Урала //Научные исследования в современном мире: проблемы, перспективы, вызовы. Материалы Второй международной молодежной научной конференции (форума) молодых ученых России и Германии в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009/13 годы (г.Уфа, 13-17 июня 2012 г.). Часть I. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2012. С.198-202.

УДК 575.17

Муллагулова Э.Р.

Государственное автономное научное учреждение «Институт региональных исследований» АН РБ, г.Сибай

ПАРАМЕТРЫ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЕСТЕСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *JUNIPERUS SABINA* L. В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРИНЦИПОВ ОХРАНЫ

Ключевые слова: можжевельник казацкий; генетическое разнообразие; популяционная структура

Неоспорима важность популяционного подхода в сохранении генетического разнообразия реликтовых, эндемичных, редких и исчезающих видов растений – фундаментальной основы биоразнообразия этой категорий организмов. Только на основе изучения пространственной и временной организации генетической структуры данных эволюционных единиц возможна расстановка приоритетов и выбор форм сохранения генетического разнообразия.

Цель и задачи исследования. На основе изучения изоферментного состава можжевельника казацкого как реликтового растения [1;2] разрабатывается дифференцированный подход в сохранении природных популяций, обладающих уникальным генофондом, создание синтетических популяций на основе объединения генофондов растений разных местообитаний, переселение их в естественные местообитания с целью восстановления генетического разнообразия природных популяций.

Материалы и методы исследования. Можжевельник казацкий *Juniperus sabina* L. является наиболее распространенным из видов можжевельника в Республике Башкортостан. Выступает одним из важных компонентов чрезвычайно уязвимых горно-степных экосистем Башкирского Зауралья. Включался во 2-е издание Красной книги Республики Башкортостан. Неприхотлив и устойчив к антропогенному воздействию, обладает развитой популяционной структурой [3;4].

Вид изучен по 9 локусам (Est-1, Dia-1, Dia-2, Lap-1, Lap-2, Fdh-1, Gdh-1, Skdh-1, бргdh-1) в 14 выборках. Результаты исследования показали относительно высокий уровень популяционного разнообразия (доля полиморфных локусов составила 62,7%). Среднее число аллелей на локус составило $3,67 \pm 0,10$ (изменяясь от 3,00 до 1,22), средняя наблюдаемая гетерозиготность - $0,17 \pm 0,09$ (изменения от 0,021 до 0,300).

Выявлен относительно высокий уровень межпопуляционной подразделенности ($F_{st}=0,116$, изменения по отдельным локусам от 0,065 для Est-1 до 0,216 для Dia-2).

Редкими аллелями установлены аллели Est-1-5, Fdh-1-1, Fdh-1-6, Gdh-1-1, Skdh-1-3, Skdh-1-7 (встречены в 1 выборке, что составляет 7,14%), Est-1-1 (встречен в 2 выборках, что составляет 14,25%), Est-1-3 (21,43%), Dia-1-1, Lap-2-1, Skdh-1-1, Skdh-1-4, Dia-2-3, бргdh-1-1 (встречены в 4 выборках, что составляет 28,54%) [5].

Анализ генетического разнообразия выборок с использованием генетической дистанции М.Нея D выявил иерархичность популяционной структуры. Значения генетических расстояний для популяций, расположенных близко или в типичных для вида местообитаниях, незначительные и составляют от 0,01 до 0,02. Так, хайбуллинские выборки в пределах одного горного хребта (Chai2, Chai4), зианчуринские (Zian) и баймакские (Bai3) популяции являются типичными примерами горной степи, где вид принимает наиболее

распространенную стланиковую форму. Наиболее генетически дивергировали крупные популяции, сильно пространственно разобщенные: популяция древовидного можжевельника на территории национального парка «Башкирия» (Kug) и популяции на хребте Ирандык Баймакского района (Bai2), $D=0,130$, а также популяции на нетипичных для вида местообитаниях – степные участки Бишбулякского района (Bisch), луговые сообщества на склоне и основании гор Бурзянского района (Burs1, Burs2, Burs4) (рис.1). Популяции в нетипичных условиях местообитания, как носители большинства уникальных генотипов, нуждаются в особом внимании при выборе мер охраны.

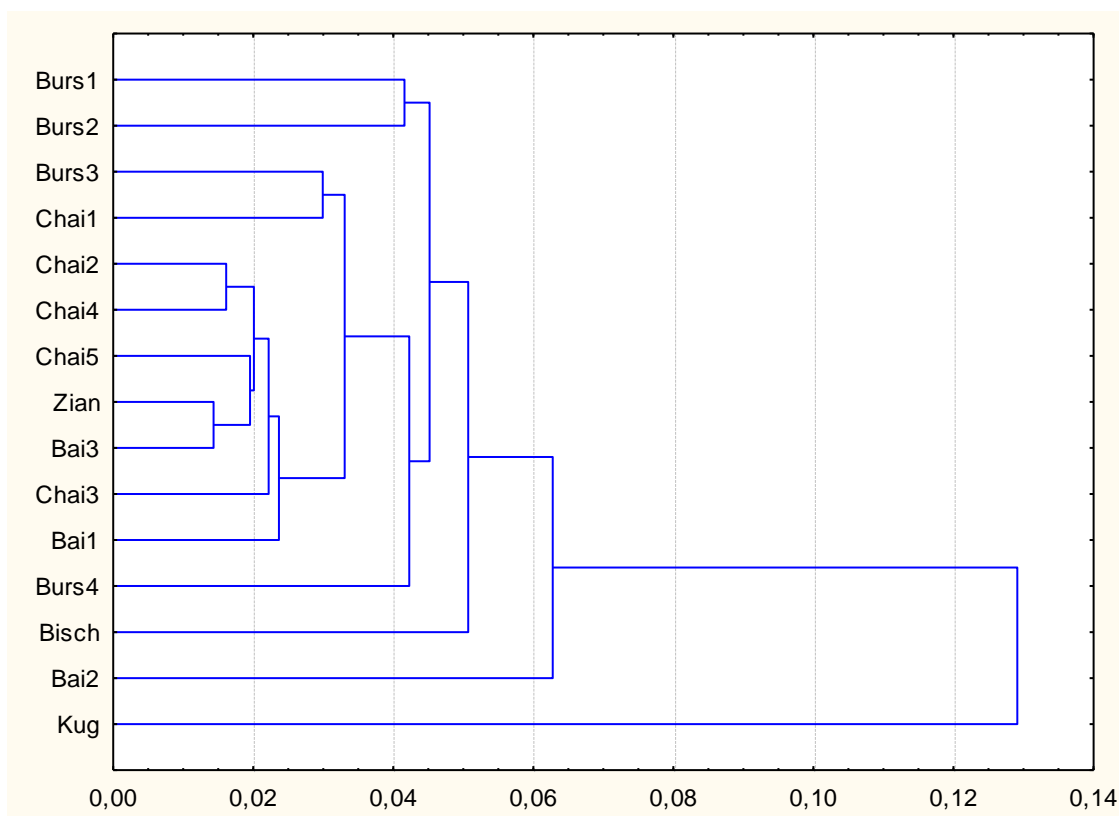


Рис. 1. Дендрограмма на основе генетических расстояний D между популяциями можжевельника казацкого

Выводы. По результатам исследования популяционного разнообразия реликтового вида можжевельника казацкого на Южном Урале выявлены уникальные генотипы, разнонаправленные изменения популяционной структуры в виде нарушений иерархичности пространственно-популяционной структурированности. Установлено, что сохранения редких генотипов требуется дифференцированный подход к их охране.

Библиографический список

1. Горчаковский П.Л. Основные проблемы исторической фитогеографии Урала // Труды института экологии растений и животных УФАН СССР. Вып.66. Свердловск, 1969. С.183-191.

2. Горчаковский П.Л., Колесников Б.П. Распространение казацкого можжевельника *Juniperus sabina* L. на Южном Урале // Ботанический журнал. 1964. Т.49, №10. С.1496-1500.

3. Муллагулова Э.Р. Популяционная структура и принципы охраны можжевельника казацкого (*Juniperus sabina* L.) на Южном Урале: Автореф. дисс. ... кандидата биол. наук, Уфа, 2009.- 16 с.

4. Путенихин В.П., Фарукшина Г.Г. Ценопопуляция можжевельника казацкого (*Juniperus sabina* L.) на хребте Иредык в Башкирском Зауралье // Вестник ОГУ №6, 2009. С.301-303.

5. Муллагулов Р.Ю., Янбаев Ю.А., Муллагулова Э.Р. Особенности межпопуляционной подразделенности можжевельника казацкого на Южном Урале /Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции «Устойчивое развитие территорий: теория и практика» (г.Сибай, 18 мая 2012 г.). – Уфа: Зауральский филиал ФГБОУ ВПО «Башкирский ГАУ»,2012. –С. 242-248.

УДК 578: 634.23

Янбаев Ю.А.¹, Редькина Н.Н.², Юсупова А.А.²

¹ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, г. Уфа

²ФГБОУ ВПО БашГУ, г. Уфа

КЛОНОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИШНИ СТЕПНОЙ ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

Ключевые слова: вишня степная; генетическая изменчивость; микросателлиты.

В последние десятилетия вследствие увеличения антропогенного давления на растительные сообщества и экосистемы, значительно возросла серьезная угроза утраты биологического разнообразия. Особенно актуальной является проблема для генетических ресурсов диких сородичей культурных растений, так как их потенциальные возможности в селекции плодовых и ягодных культур мало реализованы. В последнее время большое внимание уделяется изучению их генофонда в условиях *in situ* в целях сохранения генетической изменчивости, которая является одним из важнейших факторов, определяющих адаптивные свойства (Алтухов, 1995) и способность организмов к наибольшему использованию ресурсов среды и фитоценологических условий. Развитие современных молекулярно-генетических методов позволило поднять эти исследования на качественно новый уровень (Политов, 2007).

Культивируемые сорта вишни являются популярными пищевыми и лекарственными растениями. По этой причине актуальным является сохранение генофонда их дикорастущих сородичей, являющегося источником дальнейших селекционных работ, многоцелевого использования формового разнообразия природных популяций. В настоящее время эта научная проблема активно

изучается за рубежом (Mariette et al., 1997). К сожалению, у широко распространенной на Южном Урале и имеющей в регионе большую средообразующую роль вишни степной *Cerasus fruticosa* Pall. (*Rosaceae*) популяционная структура и факторы, ее определяющие, до сих пор не исследованы.

Цель исследований - с применением молекулярно-генетических маркеров изучить клоновое разнообразие *C. fruticosa*.

Изучение микросателлитов проводился по следующей методике. ДНК из растительного материала выделялся согласно методике (Dumolin et al., 1995). Для его количественного определения использован спектрометрический метод (биофотометр Eppendorf, Германия). Раствор разбавлялся до стандартной концентрации 10 ng/ μ L. Амплификация произведена для 8 микросателлитных локусов, описанных в литературе (Schueler et al., 2003; Testolin et al. 2000; Dirlewanger et al. 2002). Для локусов UDP98_411 (HEX), UDP98412 (HEX), UDP96005 (TET), ВРРСТ_040 (FAM)) полимеразная цепная реакция (ПЦР) осуществлялась с использованием 2,5 μ L буфера 10XPCR, 3 μ L MgCl₂ (DNA-Cloning-Service, Германия), 1 μ L смеси dNTP (Carl Roth and Co KG, Германия), 0,2 μ L Taq полимеразы (DNA-Cloning-Service) и по 0,2 μ L каждого праймера (Eurofins MWG Operon, Германия, концентрация 20 μ L), исключая праймеры UDP98412-F (HEX) и UDP98412-R, для которых использованы 1,2 и 5 μ L ДНК-матрицы, соответственно. Общий объем для ПЦР-реакции составил 25 μ L. Амплификация осуществлялась на термоциклере Biometra с первоначальной денатурацией за 4 минуты при 94°C, в 30 циклов за 25 секунд при 94°C, 25 секунд при 60°C, 45 секунд при 72°C и в конце - за 45 минут при 60°C. Для UDP96__001 (FAM), UDP98_021 (HEX), UDP98410 (TET), ВРРСТ_034 (HEX) использованы: 0,5 μ L UDP96_001-F (FAM) и UDP96_001-R, 0,3 μ L UDP98_021-F (HEX) и UDP98 021-R, 0,8 μ L UDP98 410-F (TET) и UDP98 410-R, 0,2 μ L ВРРСТ_034-F (HEX) и ВРРСТ_034-R. Количество остальных ПЦР-реагентов были теми же, что и для первой группы праймеров. ПЦР-реакция была такой же, но состояла из 25 циклов вместо 30, а температура отжига была 56°C вместо 60°C. Фрагменты анализировались на генетическом анализаторе Megabase (Amersham Biosciences, Великобритания) и обрабатывались с применением программы MegaBase Fragment Profiler v1.2 (Amersham Biosciences, Великобритания).

В изученной популяции (использованы только уникальные многолокусные генотипы) у *C. fruticosa* в 8 микросателлитных локусах выявлено $5,25 \pm 1,26$ аллелей на локус (таблица). Отличия двух типов маркеров выражено в том, что микросателлиты еще в большей степени продемонстрировали указанные выше различия особей в аллельном разнообразии. Микросателлиты подтвердили заключение, полученное по аллозимным локусам, что для *C. fruticosa* характерно в целом относительно невысокое генетическое разнообразие, по сравнению, например, с *Prunus avium* L.. Для последнего вида амплификация тех же праймеров выявила $11,37 \pm 2,04$ аллелей (изменения от 3 до 18 (Jolivet, Degen, личное сообщение). Сравнительно низкая генетическая изменчивость вишни степной увеличивает актуальность выявления полиморфных клонов

Таблица Аллельное разнообразие микросателлитных локусов *C. fruticosa*

Локус	Размер (bp)	N_A	N_A (на особь)
UDP98 411	244-274	5	2,70
UDP98 412	93-95	2	1,05
ВРРСТ 040	125-143	5	1,95
UDP96 005	107	1	1,00
UDP96 001	111-117	2	1,11
UDP98 021	104-140	7	2,06
UDP98 410	127-167	11	2,69
ВРРСТ 034	217-253	9	1,94

и местообитаний со сравнительно богатым генофондом с применением использованных нами информативных генетических маркеров.

Исследования микросателлитных локусов вишни степной проведены по Программе сотрудничества в сфере аграрных исследований между ФРГ и РФ на 2009-2011 гг. (проект № 3/07 «Oekologisch-genetische Untersuchungen im Hinblick auf Biodiversitaet und Monitoring»), руководитель д.б.н., проф. Ю.А. Янбаев) в лабораториях Института лесной генетики и селекции Федерального исследовательского центра сельскохозяйственных земель, лесоводства и рыбоводства Германии.

Библиографический список

Янбаев Ю.А., Редькина Н.Н., Юсупова А.А., Муллагулов Р.Ю. Генетическое разнообразие *Cerasus fruticosa* на Южном Урале // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. - № 6. – С. 469-470/

УДК 578 (470.57)

Федоров Н.И.¹, Редькина Н.Н.³, Янбаев Ю.А.², Михайленко О.И.¹, Самойлова Л.Ю.¹

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

²ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, г. Уфа

³ФГБОУ ВПО БашГУ, г. Уфа

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ИЗОФЕРМЕНТНЫХ ЛОКУСОВ ВИДОВ *Thalictrum* L. НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

Ключевые слова: *Thalictrum*; популяционная структура; инбридинг.

Род *Thalictrum* L. на Южном Урале представлен несколькими полиморфными видами, из которых в популяционном отношении нами изучены два - *Thalictrum simplex* L. и *Thalictrum minus* L. Выбор этой пары для исследований продиктован тем, что они, являясь широко распространенными

видами, в условиях Южного Урала отличаются по важным показателям – степени фрагментации популяций и их плотности. У *T. minus* местообитания относительно больше фрагментированы, растения представлены в них с меньшим обилием, экологическое разнообразие местообитаний выражено сильнее, чем у *T. simplex*. Поэтому была реализована попытка изучения влияния этих факторов на популяционное разнообразие видов, в том числе за счет унификации методик: отбора образцов для электрофоретического анализа изоферментов по всему Башкортостану, но попарно в одних и тех же местностях, использования одних и тех же наборов молекулярных маркеров (см. методы лабораторных анализов и статистического анализа в [1]), одинаковых (по 32 растения) объемов каждой сравниваемой выборки.

Установлено, что изученные виды близки по полиморфизму и изменчивости отдельных локусов (табл.). В среднем у *Th. simplex* среднее число аллелей на локус $\bar{A}=2.4\pm 0.08$, у *Th. minus* $\bar{A}=2.2\pm 0.16$. Ожидаемая гетерозиготность составила значения $H_E=0.255\pm 0.011$ и $H_E=0.257\pm 0.029$, наблюдаемая гетерозиготность - $H_O=0.235\pm 0.015$ и $H_O=0.251\pm 0.028$, соответственно. Коэффициенты инбридинга особей относительно популяции и вида в целом у обоих таксонов близки к нулю ($F_{IS}=0.043$, $F_{IT}=0.094$ для *Th. simplex* и $F_{IS}=-0.030$, $F_{IT}=0.063$ для *Th. minus*). В популяциях обоих таксонов наблюдается стабильность состава генотипов – их наблюдаемые и ожидаемые (согласно правила Харди-Вайнберга) распределения различаются статистически не достоверно.

Таблица Генетическое разнообразие популяций *Th. simplex* и *Th. minus*

Места взятия проб	Виды	\bar{A}	Гетерозиготность	
			H_E	H_O
1	<i>Th. simplex</i>	2.8 ± 0.3	0.275 ± 0.060	0.303 ± 0.093
	<i>Th. minus</i>	2.8 ± 0.8	0.301 ± 0.153	0.231 ± 0.122
2	<i>Th. simplex</i>	2.3 ± 0.3	0.246 ± 0.055	0.214 ± 0.046
	<i>Th. minus</i>	1.8 ± 0.5	0.260 ± 0.153	0.261 ± 0.151
3	<i>Th. simplex</i>	2.0 ± 0.0	0.187 ± 0.038	0.195 ± 0.040
	<i>Th. minus</i>	1.8 ± 0.3	0.216 ± 0.098	0.247 ± 0.115
4	<i>Th. simplex</i>	2.5 ± 0.3	0.253 ± 0.080	0.186 ± 0.080
	<i>Th. minus</i>	2.0 ± 0.4	0.334 ± 0.124	0.271 ± 0.092
5	<i>Th. simplex</i>	2.3 ± 0.3	0.298 ± 0.093	0.270 ± 0.082
	<i>Th. minus</i>	2.0 ± 0.0	0.138 ± 0.041	0.139 ± 0.041
6	<i>Th. simplex</i>	2.3 ± 0.3	0.251 ± 0.053	0.230 ± 0.103
	<i>Th. minus</i>	2.0 ± 0.0	0.183 ± 0.040	0.190 ± 0.048
7	<i>Th. simplex</i>	2.3 ± 0.3	0.243 ± 0.078	0.274 ± 0.097
	<i>Th. minus</i>	2.8 ± 0.3	0.239 ± 0.049	0.251 ± 0.050
8	<i>Th. simplex</i>	2.5 ± 0.3	0.284 ± 0.066	0.210 ± 0.050
	<i>Th. minus</i>	2.8 ± 0.3	0.388 ± 0.093	0.418 ± 0.093

Однако средние показатели не дают истинной картины строения популяционных структур изученных видов. У *Th. simplex* по полиморфизму и изменчивости локусов различия отдельных популяций относительно небольшие и составляют 2.0-2.8 (Δ , коэффициент вариации 9.7 %), 0.187-0.298 (H_E , 13.3 %) и 0.195-0.303 (H_o , 17.9 %). Популяции *Th. minus* существенно более дифференцированы - 1.8-2.8 (Δ , 20.6 %), 0.138-0.388 (H_E , 31.9 %) и 0.139-0.418 (H_o , 32.0 %).

В данной работе принят методологический подход, при котором два вида одного рода, имеющие общий ареал, одинаковую историю развития и миграции растительности, изученные в одних и тех же географических точках при помощи единого метода и с использованием одного и того же набора генетических маркеров, отличаются лишь по одному, но важному параметру – популяционной плотности (= степени обилия в ценопопуляциях). В результате исследования по разным популяционным критериям показано, что этот параметр определяет уровень межпопуляционной подразделенности.

Библиографический список

1. Популяционная структура и принципы сохранения генофонда родиолы ирмельской на Южном Урале / Янбаев Ю.А., Байрамгулов Н.Р., Редькина Н.Н., Муллагулов Р.Ю. - Уфа: БГУ, 2007. – 183 с.

УДК 638

Хисамов Р.Р., Фархутдинов Р.Г., Хасанов Ф.Р., Ташбулатов Р.К.
ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ

ОПТИМИЗАЦИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛИПНЯКОВ В ПРЕДУРАЛЬСКОЙ СТЕПИ БАШКОРТОСТАНА

Ключевые слова: липняки, пчеловодство, медоносные ресурсы, пчелосемьи.

Республика Башкортостан традиционно ассоциируется у потребителей с высококачественным медом. Следовательно, при рассмотрении вопросов продуктивности лесных и луговых экосистем, возникают задачи, связанные с интенсификацией ведения пасечного хозяйства. Особенно это касается медоносных угодий территории Башкирского Предуралья или Западного Башкортостана.

Западный регион Башкортостана по облесенности представлен двумя группами районов: 1. Находящимися в зоне Белебеевской возвышенности, где облесенность составляет не менее 25%, при общей лесопокрытой площади 338400 га, в том числе липняков – 86600 га. 2. Менее облесенными районами, с общей лесопокрытой площадью 142300 га, в том числе 19200 га липняков.

В каждой из этих двух групп имеются районы с отличающимися от общей выборки показателями. Так, например, в первом случае это Бижбулякский район, где очень мала площадь липняков (около 600 га), а во втором – Альшеевский район с площадью липняков свыше 8000 га. Однако, несмотря на эти исключения, районы внутри территории этих двух зон в Западном регионе Башкортостана характеризуются сходными условиями по потенциальной медоносной базе лесных угодий. За исключением отмеченных выше случаев, в первой группе районов площади липняков варьируют от 8400 до 25000 га на один административный район, во втором варианте от 1600 до 3700 га.

В наших исследованиях по анализу кормовой базы пчеловодства на лесных массивах были охвачены в основном лесхозы на территории Белебеевской возвышенности в связи с наличием здесь большой площади естественных липняков. Для выяснения роли последних в общей кормовой базе стационарных лесных пасек были определены площади липняков на припасечных участках всех лесничеств Бакалинского лесхоза с учетом их группы возраста (молодняки, средневозрастные, приспевающие, спелые и перестойные). Продуктивность самого пчеловодства была учтена по отчетным показателям количества пчелосемей на пасеку, а также выходу товарного меда по всей пасеке и отдельным пчелосемьям. В этой серии опытов на пчелиных “точках” с учетной площадью 1250 га учитывалась только площадь липняков, а остальные медоносы и пыльцевые ресурсы во внимание не принимались, поскольку этот вопрос требует самостоятельного рассмотрения. Все эти параметры были подвергнуты математической обработке с использованием программы STATGRAF.

Исходя из вышеизложенного, зависимость эффективности пчеловодства от площадей липняков в припасечных участках на территории Бакалинского лесхоза была определена методом расчета коэффициентов парной корреляции. До проведения настоящих исследований ранее такие обобщенные результаты другими авторами не рассматривались.

Как видно из табл. 1, количество пчелосемей и соответственно выход общего товарного меда в пасеках на территории отдельных лесничеств Бакалинского лесхоза сопряжены сильной связью с площадью лесов ($r=0,58-0,69$) и еще более сильной связью – с общей площадью липняков ($r=0,74-0,78$). Такая зависимость вполне логична, поскольку размещение и общее количество пасек, несомненно, зависит от размеров территории лесов.

На припасечных участках данной территории общая площадь липняков варьирует от 54 до 518 га, составляя в среднем 239 га. Такое сильное варьирование присуще и липнякам всех возрастных групп, т.е. в настоящее время эксплуатация липняков здесь не оптимизирована. Вместе с тем, обращает на себя внимание наличие очень сильной корреляционной связи между выходом товарного меда на отдельную пчелосемью и площадью спелых и перестойных липняков в припасечных участках, т.е. пчелиных “точках” ($r=0,88$). Следовательно, именно эта площадь липняков определяет в конечном

итоге важную роль в общей площади липняков ($r=0,71$), в которой приспевающие деревья фактически не влияют на выход товарного меда с отдельной пчелосемьи ($r=-0,07$ и $0,24$), а эффект средневозрастных липняков ($r=0,37$), в большей степени зависит, по-видимому, от медоносного подлеска. Из этой же таблицы можно заметить, что количество пчелосемей в пасеках не связано с площадями разновозрастных липняков ($r=-0,04-0,28$), что свидетельствует о возможности дальнейшего увеличения их до оптимального уровня.

Таблица 1. Площади липняков в припасечных участках Бакалинского лесхоза, га

Показатели	Площадь всех лесов*		Липняк и припасечные	в т.ч. по группам возрастов			
	общая	в т.ч. липняк и		молодняки	средне-возрастные	приспевающие	спелые и перестойные
1. Лесопокрытая площадь, га	63894	19120					
2. Варьирование	--	--	54 - 518	2-81	23 -186	7-254	11-334
3. Среднее на пасеку	--	--	239	18	65	56	100
4. Коэффициенты корреляции							
а) количество пчелосемей	0,58	0,74	0,01	-0,04	0,11	0,28	-0,27
б) товарный мед на пчелосемью	0,01	-0,21	0,71	-0,07	0,37	0,24	0,88
в) товарный мед на пасеку	0,69	0,78	0,42	-0,12	0,41	0,46	0,21

* В выборке использованы показатели облесенности 7 лесничеств Бакалинского лесхоза и площадей липняков в них.

По данным Н.И.Никитина и др. (2002 г.) количество товарного меда на отдельную пчелосемью связано слабой положительной корреляцией с общим объемом товарной продукции отдельных пасек в массивах липняков ($r=0,21$). Это подтверждает высказанную нами мысль и свидетельствует об имеющихся медоносных ресурсах в повышении как общей продукции пасек, так и отдельных пчелосемей в них. В этой же работе установлено, что количество пчелосемей в отдельных пчелиных «точках» и общий выход товарного мёда со всей пасеки связаны сильной зависимостью ($r=0,83$), это настолько очевидная истина, что она и не требует, казалось бы, особых доказательств: больше пчелосемей – больше товарного мёда с пасеки. Вместе с тем показано, что количество пчелосемей отрицательно коррелирует с выходом товарного мёда на отдельную пчелосемью ($r=-0,36$). Не исключено, что на имеющихся

припасечных участках анализируемого нами Бакалинского лесхоза частично проявляется и конкуренция между отдельными пчелосемьями за нектарные ресурсы имеющихся липняков. Однако этот вопрос без учета всех медоносных ресурсов пчелиных «точков» не может быть решен окончательно. Установлено, что в выборке всех пасек наблюдается сильное варьирование площадей липняков в припасечных участках.

Интересная закономерность проявляется при оценке роли разновозрастных липняков в выходе товарного меда на отдельных пасеках. Как видно из табл. 1, коэффициенты корреляции средней силы выявлены для таких факториальных показателей, как площади средневозрастных и приспевающих липняков ($r=0,41$ и $0,46$). Их нектаропродуктивность не может являться главным фактором выхода товарного меда, поскольку цветки липняков этого возраста не являются преобладающими в нектаропродуктивности. Площадь липняков этого возраста составляет не менее 50% площади липняков и в них имеются дополнительные ресурсы медоносов на массивах опушек и подлеска. Следовательно, в общей медоносной продуктивности липняков важная роль принадлежит не только спелым липнякам, но и массивам медоносного подлеска и опушек, а также сопутствующих им лесов.

Как уже было отмечено выше, в настоящей работе впервые поставлена задача оптимизации использования липняков в отрасли пчеловодства. В этой связи необходимо подчеркнуть, что на припасечных участках липняков Бакалинского лесхоза эксплуатируются около 5000 га липняков из общего массива в 19147 га. Отсюда следует, что количество лесных пасек на территории Бакалинского лесхоза может быть увеличено в перспективе не менее чем в 4 раза. Но для этого необходимо более подробное геоботаническое описание территории с учетом всех лесных медоносных ресурсов.

В табл. 2 представлена информация по лесным медоносным ресурсам на всей территории Белебеевской возвышенности, включая Бакалинский лесхоз. Количество пчелосемей в данной зоне связано с коэффициентом корреляции средней силы с общей площадью лесов ($r=0,54$), при этом площадь лесов слабо коррелирует с объемом медосбора ($r=0,29$). Вместе с тем для этих же показателей выявлены сильные связи между площадью липняков в лесхозах анализируемой зоны ($r=0,76$ и $0,63$). Существенные корреляционные связи обнаружены в тех же лесхозах между показателями эффективности функционирования пасек и объемом рубок ухода ($r=0,86$ и $0,64$) и заготовок сена в зоне гослесфонда ($r=0,52$ и $0,75$). Все это свидетельствует о важности кормовой базы пчеловодства, представленной в лесных массивах в виде подлеска на территории рубок ухода, а также лесными сенокосами и опушками. Сюда же относятся медоносные ресурсы кленовников и ивняков.

Лесные медоносные ресурсы на остальной территории западного региона Башкортостана, включающего Илишевский, Дюртюлинский, Чекмагушевский, Буздякский, Благоварский, Давлекановский и Альшеевский районы не менее богаты, чем в первой группе районов. Как видно из табл. 2, это касается территорий всех лесных медоносных угодий. Вероятно, именно с этим связан

тот факт, что впервых семи районах имеется около 30 тыс. пчелосемей, а в других семи – только 17тыс.

На основании анализа рассмотренных выше данных можно прийти к заключению, что по богатству естественных медоносов в лесных массивах, а также в агроценозах зона Белебеевской возвышенности характеризуется особенно благоприятными условиями для развития пчеловодства.

Таблица 2 Медоносные ресурсы лесов Западного региона РБ, га*

Районы	Лесопокрытая площадь, га	Липа	Клен	Ивовые	Вырубки и опушки	Сенокосы	Итого лесных медоносов, га
Зона Белебеевской возвышенности							
1. Бакалинский	63894	19120	274	176	4430	1543	25543
2. Шаранский	35118	8440	364	39	2630	423	11896
3. Туймазинский	74431	25012	998	83	4830	2669	33592
4. Белебеевский	68816	11859	581	5	5640	1328	19413
5. Ермекеевский	21738	13072	67	2	860	415	14416
6. Бижбулякский	34409	568	67	23	3380	707	4745
7. Миякинский	39909	8550	513	630	3020	1195	13908
Всего, га	338405	86621	2864	1138	24790	8280	123690
Коэффициенты парной корреляции:							
Количество пчелосемей	0,54	0,76			0,86	0,52	
Объем медосбора	0,29	0,63			0,64	0,75	
Остальная территория западного региона РБ							
Всего, га	142294	19201	912	1308	12100	4036	37557

* по данным Д.Г. Аскарлова и Р.Р. Хисамова (2000).

Основной проблемой на сегодняшний день является то, что располагая хорошими возможностями, как для экстенсивного, так и интенсивного развития пчеловодства, в регионе не решены вопросы детальной инвентаризации имеющихся медоносных ресурсов и не разработаны условия реализации этих возможностей на основе геоботанических обследований и интенсификации кочевого пчеловодства.

Те же проблемы стоят и перед отраслью пчеловодства в менее облесенных районах Западного региона Башкортостана. Одновременно с решением всех этих проблем с целью интенсификации пчеловодства необходимо также дополнительно укрепить кормовую базу пчеловодства за счет посевов ценных медоносных культур вблизи стационарных пасек.

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ГЕНЕТИКЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

УДК 575:636.2

Валитов Ф.Р., Хаков Р.М.

ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДИСТАНЦИЙ МЕЖДУ ПОРОДАМИ ПРИ СЕЛЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ключевые слова: генофонд, селекция, генетическая дистанция, крупный рогатый скот.

При углубленной селекционной работе с породами, линиями и стадами крупного рогатого скота селекционерам необходима информация об особенностях филогенеза этих популяций, проанализированная с помощью генетических маркеров. Необходимыми элементами в получении такой информации являются вычисление показателей генетической дистанции, проведение кластерного анализа, построение дендрограммы и ее анализ [5].

Целью настоящего исследования являлся сравнительный анализ частот встречаемости эритроцитарных антигенов крови и расчет генетической дистанции популяций крупного рогатого скота разных пород разводимых в Республике Башкортостан.

Объектом изучения служили племенные коровы маточного поголовья черно-пестрой ($n=6362$), симментальской ($n=2466$), бестужевской ($n=1145$), голштинской ($n=706$), герефордской ($n=414$) и лимузинской ($n=44$) пород из 77 племенных хозяйств Республики Башкортостан. Группы крови определяли стандартными серологическими тестами с использованием 54 моноспецифических сывороток. Частота антигенов, аллелей и генотипов в популяциях животных вычислены согласно методике А.М. Машурова и др [4]. Индекс генетического сходства популяции рассчитали при помощи формулы Маяла и Линдстерема [2]. Показатели генетических дистанций вычисляли по формуле А.С. Серебровского на основе анализа распределения частот антигенов групп крови [5].

Сравнивая генотипическую структуру 6 пород разводимых в республике, можно наблюдать как сходство частот антигенов, так и их различие.

По всем породам наблюдается высокая концентрация антигенов F (0,76-0,98) и A₂ (0,42-0,79). Черно-пестрая и бестужевская порода отличаются от других сравниваемых пород высокой концентрацией антигена C₁ (0,46-0,55); симментальская порода - антигенов H', C₂ и A₁ (0,44-0,62), герефордская порода - E, Y₂, C₂ (0,61-0,70) и лимузинская порода - H', E₃, W (0,73-0,93).

Выявленное сходство и различие пород, выраженное индексом сходства по антигенам групп крови, представлено в табл. 1.

Таблица 1 Индекс генетического сходства (г) между породами

Порода	Симментальская	Бестужевская	Голштинская	Герефордская	Лимузинская
Черно-пестрая	0,929±0,035	0,937±0,033	0,907±0,040	0,850±0,049	0,801±0,056
Симментальская	-	0,910±0,039	0,886±0,043	0,843±0,050	0,801±0,056
Бестужевская	-	-	0,886±0,043	0,853±0,049	0,790±0,057
Голштинская	-	-	-	0,838±0,051	0,792±0,057
Герефордская	-	-	-	-	0,776±0,059

Установлено, что молочные черно-пестрая и голштинская породы по антигенной структуре ближе к комбинированным симментальской и бестужевской породам и более отдалены от мясных герефордской и лимузинской пород. Различия между породами по индексу генетического сходства достоверны ($p < 0,05$).

Индекс генетического сходства показал, что породы молочного и комбинированного направления продуктивности по сравнению с мясным направлением имеют более высокие антигенные отличия между собой, чем животные одного направления продуктивности, что нашло свое отражение в дендрограмме их филогенетических взаимоотношений (рис. 1).

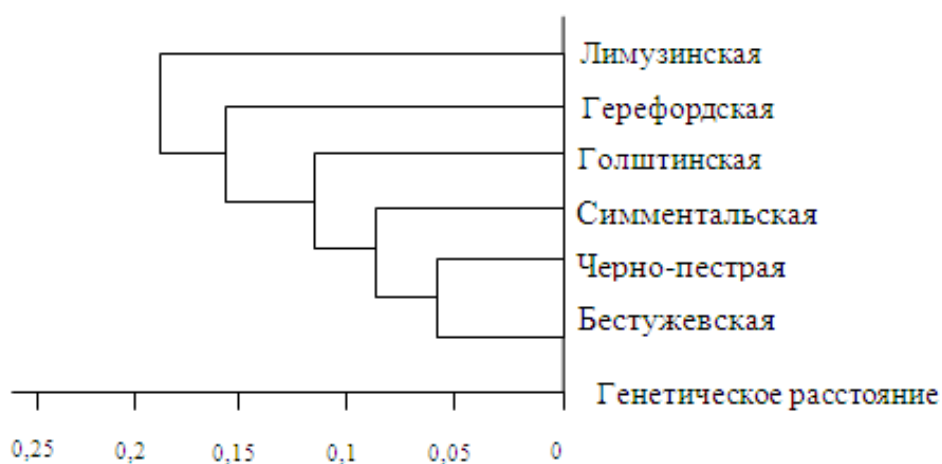


Рис. 1 Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между породами молочного, комбинированного и мясного направления продуктивности крупного рогатого скота РБ

В процессе селекции животных в каждой породе и популяции формируется свой генофонд и определенные генотипы по группам крови, характеризующие стадо. Данные о генофондах необходимо вовлекать в селекционный процесс.

Библиографический список

1. Гончаренко, Г.М. Генетика на службе у селекционеров [Текст] / Г.М. Гончаренко // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки.–2005.–№ 4.–С 57–63.
2. Деева, В.С. Группы крови крупного рогатого скота и их селекционное значение [Текст] / В.С. Деева, И.О. Сухова // РАСХН. Сиб. отд-ние. СибНИПГИЖ. - Новосибирск, 2002. - 172 с.
3. Максимова, А. Использование иммуногенетических маркёров при выведении внутривидового типа айрширского скота [Текст] / А. Максимова, И. Петрачкова, Т. Шульга // Молочное и мясное скотоводство. - 2008.-№5.- С.33-38.
4. Машуров, А.М. Алгоритмы иммунобиохимической генетики [Текст]: учеб.-метод. пособие / А.М. Машуров, Н.О. Сухова, Р.О. Царев, Х.Х. Тхань. – Новосибирск, 1998. – 112 с.
5. Машуров, А.М. Учитывать генетические дистанции между породами при селекции [Текст]: / А.М. Машуров, В.И. Черкащенко // Разведение, селекция, генетика. – 1987. №3. – С.21-23.

УДК 619:591.156:636.2

Гайнуллина К.П., Андреева Е.С., Фаузетдинова Э.Т.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛОШАДЕЙ БАШКИРСКОЙ ПОРОДЫ

Ключевые слова: лошадь; башкирская порода; генетические маркеры; микросателлиты; полиморфизм; аллель; генотип.

Введение. В Республике Башкортостан одной из плановых является башкирская порода лошадей [1]. Для башкирской лошади характерны небольшие рост и живая масса, хорошая молочность при высокой оплате корма и отличная приспособленность к местным условиям [3]. Порода создана методом народной селекции на основе местной лошади, затем в ходе эволюции подвергалась интенсивному генетическому влиянию ряда заводских пород (тяжеловозных, верховых и рысистых). Массовая метизация породы с заводскими с конца 19 и до начала 20 веков привела к формированию в различных регионах республики неоднородных в генетическом отношении массивов с различным уровнем хозяйственных признаков, трудно поддающихся селекционному прогнозу [4]. Поэтому изучение генетической структуры башкирской породы лошадей является актуальным и имеет основополагающее значение в совершенствовании этой породы. На сегодняшний день самым эффективным, информативным и достоверным методом, используемым в фундаментальных и прикладных исследованиях, является применение ДНК-маркеров, в частности, микросателлитов [5].

Микросателлитные последовательности (SSR, Simple Sequence Repeats) представляют собой короткие (до 100 п.о.) tandemные повторы коротких фрагментов (2–10 п.о.), которые широко распространены в геномах эукариот и встречаются в прокариотических геномах [6]. Микросателлиты представляют собой идеальную систему для создания молекулярных маркеров, обладая высочайшим уровнем полиморфизма, обеспечивая легкость генотипирования и кодоминантное проявление [2].

Цель и задачи исследования. Целью данной работы послужило изучение генетического разнообразия лошадей башкирской породы с помощью микросателлитных маркеров. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) определить частоты встречаемости аллелей и генотипов в популяции лошадей башкирской породы; 2) выявить наиболее информативные микросателлитные локусы для башкирской породы лошадей; 3) установить минимальное количество SSR-маркеров, необходимых для идентификации лошадей башкирской породы.

Условия, материалы и методы исследования. Работу проводили в лаборатории молекулярно-генетической экспертизы ГНУ Башкирский НИИ сельского хозяйства. Материалом для исследования послужило поголовье лошадей башкирской породы ООО «Башагроген» Кушнаренковского района РБ (n=60, из них 28 кобыл, 28 жеребят и 4 жеребца). Тотальную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической венозной крови с помощью коммерческого набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas») согласно инструкции производителя. Для анализа было использовано 6 микросателлитных локусов: HTG10, АНТ4, HMS3, HMS7, HTG4, ASB2, входящих в панель микросателлитов, рекомендованную ISAG (International Society of Animal Genetics). Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «ДТ-322» фирмы «ДНК-Технология» по программе: денатурация при 94°C - 10 мин.; 30 циклов: денатурация при 94°C - 30 сек., отжиг праймеров при 55°C - 30 сек., элонгация при 72°C - 1 мин.; конечная элонгация при 72°C - 30 мин. Продукты амплификации разделяли электрофоретически в 8% неденатурирующем полиакриламидном геле при 300 В в течение 3-3,5 часов. Гель-документирование осуществляли с помощью видеосистемы «Gel Imager».

Результаты исследования

В результате молекулярно-генетического исследования 60 образцов ДНК лошадей методом SSR-PCR были получены данные по аллельному состоянию 6 микросателлитных локусов. На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов амплификации локуса АНТ4.

В результате анализа полученных данных были определены частоты аллелей и генотипов по всем изученным нами локусам. На рисунке 2 представлены диаграммы, отражающие распределение частот аллелей и генотипов по локусам АНТ4, HTG10, HMS3, ASB2, HTG4, HMS7. Было

установлено, что по локусу АНТ4 чаще остальных встречались аллели 1 (30%) и 4 (46%), и превалировал генотип 14 (53%). По локусу НТG10 для башкирской породы лошадей было обнаружено преобладание аллелей 3 (38%) и 5 (36%), и генотипа 35 (52%). По локусу НMS3 у исследованных нами лошадей наиболее часто встречались аллели 3 (41%) и 6 (34%), и генотип 14 (60%). Локус ASB2 у башкирской лошади характеризовался относительно равномерным распределением частот аллелей и генотипов. Исключение составили редко встречающиеся генотипы 34, 15, а также аллель 3. Из диаграммы, построенной на основе данных о процентном соотношении аллелей и генотипов по локусу НТG4, видно, что у башкирской лошади выявились редко встречающиеся аллели 3 и 6, остальные аллели были распределены более-менее равномерно; чаще других встречался генотип 14 (47%). Для локуса НMS7 у башкирской породы лошадей было характерно преобладание аллелей 3 (48%) и 6 (41%), и генотипа 36 (82%).

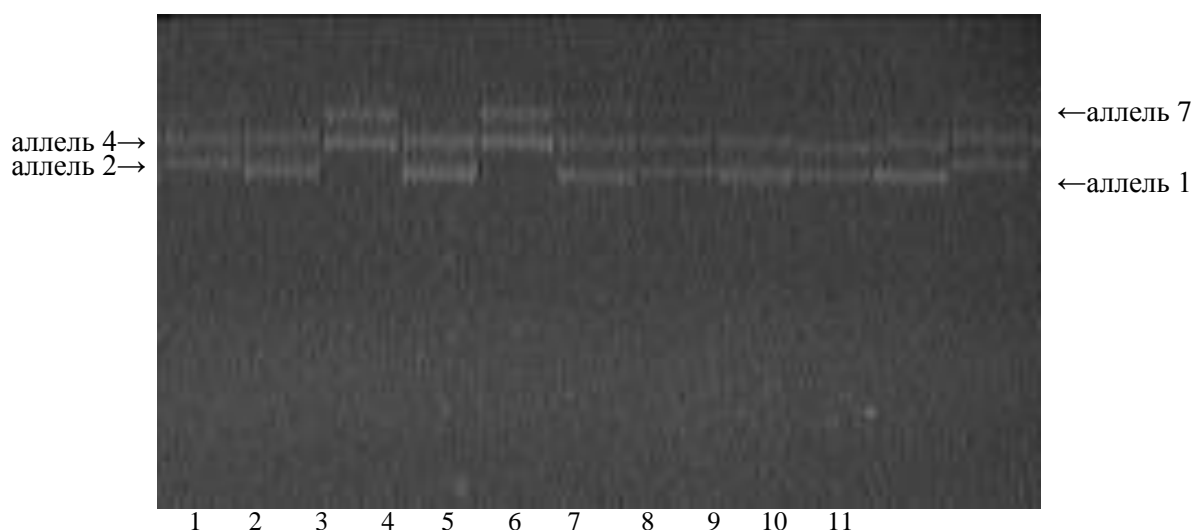
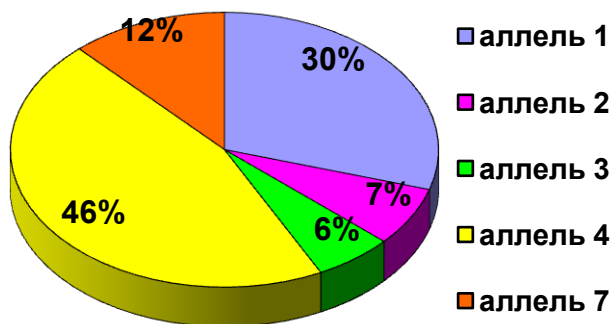


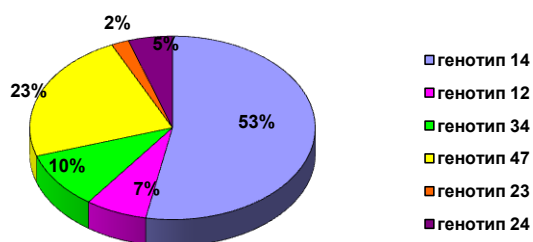
Рис. 1. SSR-спектры некоторых образцов, полученные при амплификации локуса АНТ4.

В каждом из изученных локусов идентифицировано до 7 аллелей, в среднем 6,0 аллелей на локус. Индекс полиморфности менялся от 0,59 (НMS7) до 0,75 (ASB2). Средний уровень полиморфизма составил 68%. Таким образом, все изученные нами микросателлитные маркеры обладали высоким уровнем полиморфности, что обеспечивает их эффективность в контроле достоверности происхождения лошадей башкирской породы. На рисунке 3 приведена электрофореграмма амплифицированных фрагментов (локус НТG10), демонстрирующая подтверждение родственной связи между образцами ДНК, принадлежащими кобыле и полученному от нее жеребенку, а также определение методом исключения жеребца, являющегося отцом данного жеребенка.

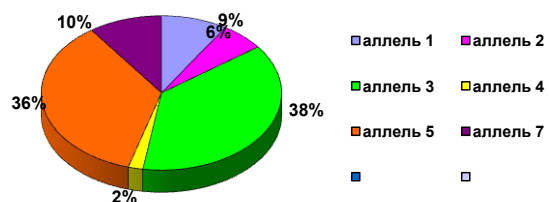
Частоты аллелей локуса АНТ4



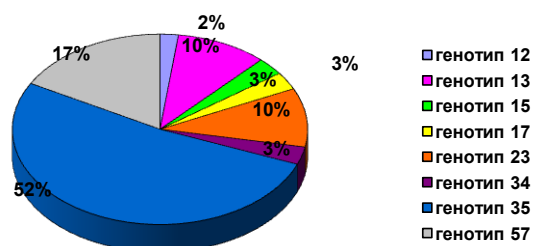
Частоты генотипов локуса АНТ4



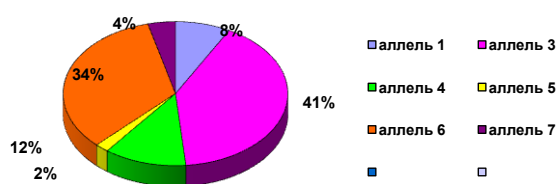
Частоты аллелей локуса НТG10



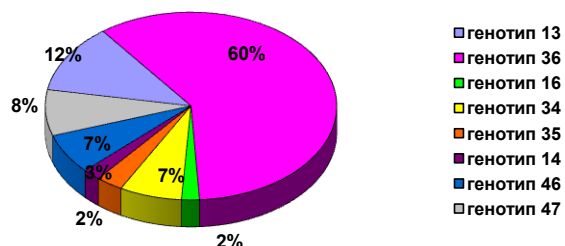
Частоты генотипов локуса НТG10



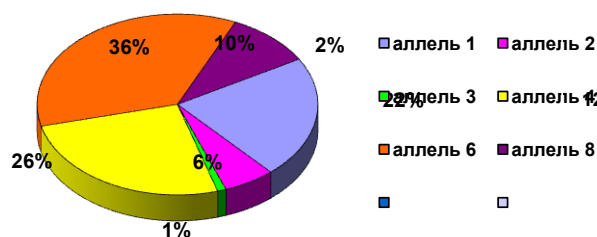
Частоты аллелей локуса НMS3



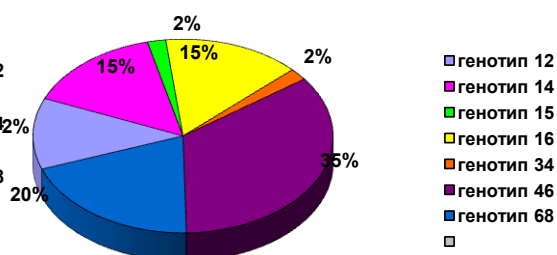
Частоты генотипов локуса НMS3



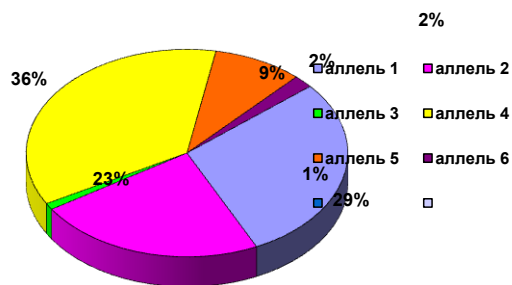
Частоты аллелей локуса АSB2



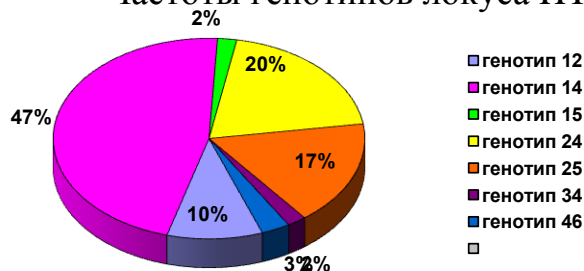
Частоты генотипов локуса АSB2



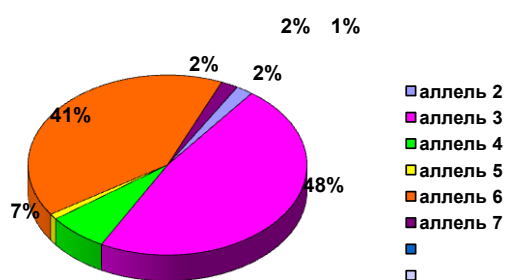
Частоты аллелей локуса HTG4



Частоты генотипов локуса HTG4



Частоты аллелей локуса HMS7



Частоты генотипов локуса HMS7

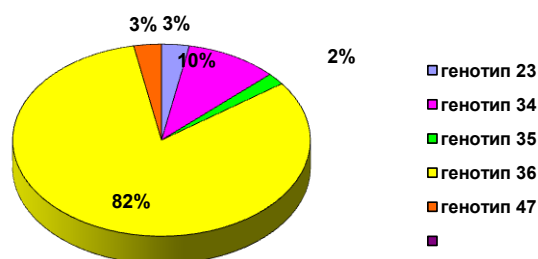


Рис. 2. Частоты аллелей и генотипов микросателлитных локусов АНТ4, HTG10, HMS3, ASB2, HTG4, HMS7

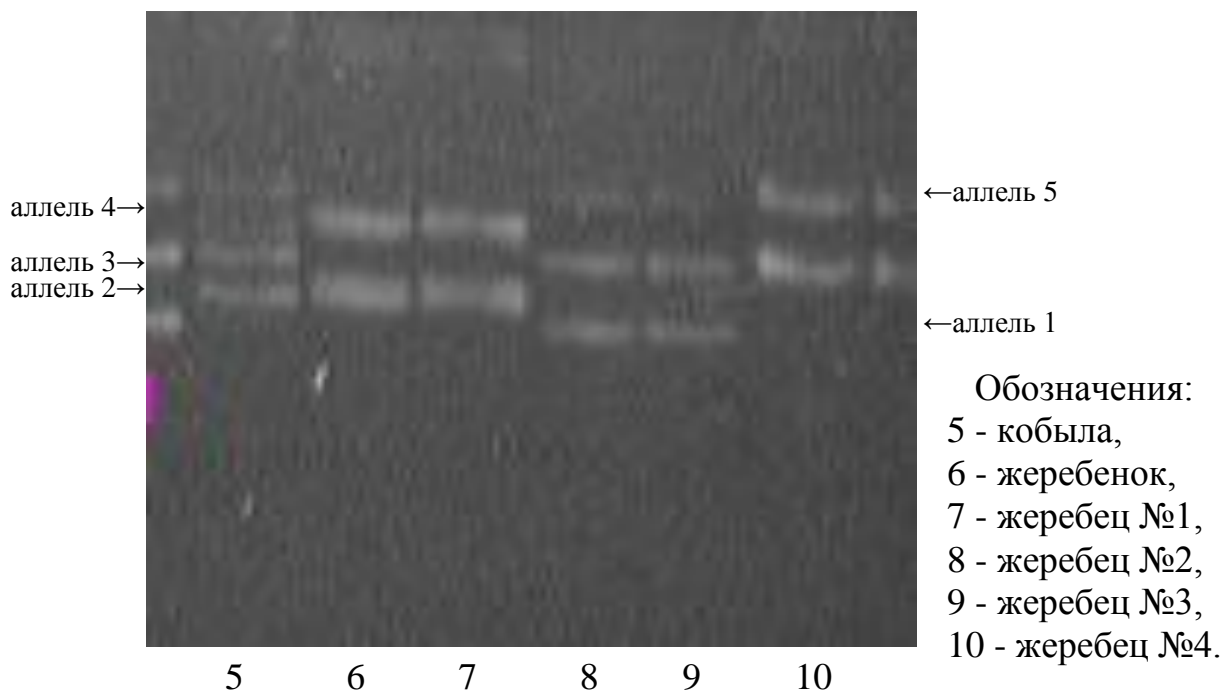


Рис. 3. SSR-спектры некоторых образцов, полученные при амплификации локуса HTG10.

Видно, что жеребенок унаследовал от матери аллель 2. Другой аллель (аллель 4) жеребенок получил от отца, которым, исходя из сопроводительного документа, является жеребец №1 (фиксированная случка). Действительно, из рисунка видно, что искомый аллель содержится только в генотипе жеребца №1 в то время, как в генотипах трех остальных жеребцов (№2, 3, 4) данный аллель отсутствует.

Нами было установлено, что для однозначной идентификации 60 исследованных образцов достаточно использовать 6 микросателлитных маркеров, то есть сочетание аллелей по исследованным нами локусам было уникальным для каждого образца.

Выводы

1. Получены данные о частоте встречаемости аллелей и генотипов в популяции лошадей башкирской породы.

2. Среди изученных микросателлитных локусов в среднем было выявлено 6,0 аллелей на локус. Индекс полиморфности составил 59% - 75%, что говорит о высокой информативности исследованных локусов при идентификации лошадей башкирской породы.

3. Установлено, что для определения достоверности происхождения исследованных животных было достаточно использовать набор из 6 SSR-маркеров.

Библиографический список

1. Башкортостан: Краткая энциклопедия. — Уфа: НИ Башкирская энциклопедия, 1996. — 672 с.

2. Коновалов, Ф.А. Картирование и молекулярно-генетический анализ генов гороха (*Pisum sativum* L.): Дис.... канд. биол. наук: 03.00.15. / Коновалов Федор Андреевич. - М., 2006. - 126 с.

3. Развитие мясного табунного коневодства в России. Методические рекомендации / ФГНУ «Росинформагротех». - М., 2007. — 176 с.

4. Хворов, В.В. Популяционно-генетический полиморфизм башкирской породы лошадей: Дис.... канд. биол. наук: 06.02.01. / Хворов Владимир Владимирович. - СПб., 2001. - 121 с.

5. Храброва Л.А. Методические положения по использованию ДНК-анализа лошадей для оценки генетических ресурсов в коневодстве / Л.А. Храброва и др. – Дивово, 2011. – 28 с.

6. Morgante M., Hanafey M., Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes // Nature Genetics. – 2002. - V. 30, № 2. – P. 194 - 200.

УДК 636.597.082.12

Ганиева И.Н., Долматова И.Ю.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПЕКИНСКИХ УТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RAPD-МАРКЕРОВ

Ключевые слова: RAPD-маркеров, микроэволюция, дендрограмма, утки, ПЦР.

Промышленные популяции сельскохозяйственной птицы являются хорошей моделью пороодообразовательных и микроэволюционных процессов, происходящих в них при условии сильного давления искусственного отбора. Изучение дивергенции геномной ДНК в ряду поколений на молекулярном уровне позволило бы получить новые данные об эволюции геномов под действием селекции и гибридизации. С этой точки зрения представляется целесообразным использование RAPD-маркеров, обладающих высокой разрешающей способностью. В исследованиях ряда авторов [1] показано, что сравнительный анализ частот отдельных RAPD-фрагментов наглядно и достаточно объективно позволяет выявлять даже небольшие изменения генетических структур. Нами показано, что уже в ряду родители-дети происходят вполне заметные изменения первичных последовательностей ДНК, выявляемые при помощи RAPD-маркеров. В связи с этим, мы провели RAPD-анализ дивергенции последовательностей ДНК, произошедшей под действием отбора различной интенсивности в ходе селекционного процесса.

Целью работы является оценка степени генетической дифференциации внутривидовых линий пекинских уток с использованием RAPD-маркеров.

Материалом исследования послужили утки пекинской породы, которые состоят из следующих линий: 1) М1 и М2 – соответственно отцовская и материнская линии пекинских уток, кросс Медео; 2) Б1 и Б2 – соответственно отцовская и материнская линии кросса «Благоварский»; 3) БЦ1 и БЦ2 – линии уток «Башкирской цветной» породы.

На Благоварском ГУП ППЗ имеются разные модели содержания уток, характеризующиеся разной степенью давления отбора. Селекционная работа с ними проводится методом комбинированной селекции (семейной в сочетании с индивидуальной оценкой особей сразу по целому комплексу признаков продуктивности).

Наряду с семейно-гнездовым содержанием линий Б1 и Б2, на Госплемптицеводе в качестве генофондной единицы сохраняются исходные линии М1 и М2, которые содержатся группами в секциях при соотношении полов 1:3(4), являющимся оптимальным для сохранения воспроизводительных качеств и продуктивности.

Первый забор крови производился в 1996 году, второй - спустя 2 года, в 1998. За этот период произошло две смены поколений, то есть если поколение 1996 года условно обозначать как F_1 то следующее исследование проведено с поколением F_2 . У Башкирской цветной породы уток забор крови производили в 2002 году.

Проводя сравнительный анализ частот отдельных фрагментов ДНК, амплифицированных с праймером НМ13, можно отметить, что у всех линий есть полосы с одинаковой частотой (4, 10 и 15 полосы).

У линий БЦ1 и БЦ2 появляется новая 16 полоса, но при этом отсутствуют 3, 5, 7, 9, 11 и 14 полосы.

Достаточно высокий уровень изменений RAPD-спектров в F_2 по сравнению с F_1 отражает произошедшие за два поколения изменения в первичной структуре ДНК. Насколько глубока произошедшая дивергенция, можно судить по оценкам генетических расстояний, представленных в таблице 1. Из таблицы видно, что между линиями М1 и М1(F_2) (коэффициент сходства -

0,724) и M2 - M2(F₂) (коэффициент сходства - 0,776) произошла дивергенция и между линиями Б1 - Б1(F₂) и Б2 - Б2(F₂) (коэффициенты сходства соответственно 0,751 и 0,771).

Таблица 1. Коэффициенты генетического сходства различных линий пекинских уток.

	M1	M2	Б1	Б2	Хаки	Белог	Гибр	БЦ1	БЦ2	M1(F ₂)	M2(F ₂)	Б1(F ₂)	Б2(F ₂)
M1	-	0,895	0,739	0,736	0,583	0,736	0,734	0,614	0,619	0,724	0,729	0,694	0,760
M2		-	0,782	0,736	0,601	0,742	0,719	0,627	0,663	0,714	0,776	0,705	0,801
Б1			-	0,884	0,684	0,738	0,642	0,731	0,781	0,714	0,724	0,751	0,823
Б2				-	0,641	0,672	0,614	0,763	0,781	0,727	0,685	0,719	0,771
Хаки					-	0,794	0,724	0,630	0,646	0,631	0,621	0,687	0,620
Белог						-	0,772	0,651	0,654	0,613	0,624	0,697	0,712
Гибр							-	0,544	0,529	0,618	0,552	0,565	0,597
БЦ1								-	0,848	0,681	0,613	0,732	0,703
БЦ2									-	0,667	0,648	0,784	0,764
M1(F ₂)										-	0,769	0,671	0,684
M2(F ₂)											-	0,702	0,686
Б1(F ₂)												-	0,826
Б2(F ₂)													-

На дендрограмме, демонстрирующей филогенетические взаимоотношения исследуемых линий, можно видеть, что линии кросса Медео и кросса Благоварский, и породы Башкирских цветных составляют отдельные кластеры, что отражает произошедшую между ними дивергенцию. Отдельная ветвь на дендрограмме образована из уток с окраской оперения типа хаки и белогрудых, к которой примыкает выборка из гибридной (Б1*Б2) популяции уток. Данное расположение можно объяснить тем, что пробы крови у цветных уток были взяты через 3 года после выявления их в кроссе Благоварский, то есть в период начала формирования новой породы, когда производился близкий инбридинг. Пробы крови у линий БЦ1 и БЦ2 были взяты уже у хорошо сформировавшейся породы в 2004 году.

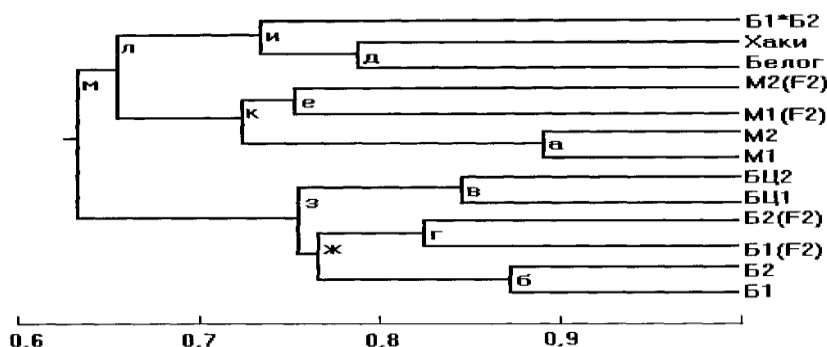


Рисунок 1. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между различными поколениями исследованных линий пекинских уток.

Процесс создания новых линий и формирование у них определенных желательных признаков всегда связан с преобразованием исходного генетического материала. При этом формообразование приводит к углубляющейся генетической дифференциации и дивергенции каждого последующего поколения от родительских форм. Формообразование на молекулярном уровне осуществляется в основном посредством генетических рекомбинаций. Существует мнение [3, 4], что генетические рекомбинации не создают ничего нового, а служат только для перекомбинирования существующих генов. Поэтому традиционно главная роль в эволюции приписывается мутационной изменчивости, тогда как изменениям биологической организации, происходящим в результате генетических рекомбинаций, чаще отводится второстепенная роль. Биологическое значение рекомбинаций состоит в объединении в одном организме по-разному специализированных генов, и в молекулярном смысле понятия мутации и рекомбинации отражают одно и то же - изменения в составе первичной структуры молекул ДНК. Эти изменения могут быть выявлены при помощи RAPD-маркеров, и, как показали наши исследования, являются движущей силой микроэволюционных и формообразовательных процессов, происходящих под действием селекции.

Показано, что величины генетических расстояний, рассчитанные на основании RAPD-маркеров, достаточно тонко и объективно отражают даже небольшие изменения генетической структуры внутривидовых линий пекинских уток в ходе преобразования исходных родительских форм.

Библиографический список

1. Мельникова М.И. Исследования полиморфизма и дивергенции геномной ДНК на видовом и популяционных уровнях /М.И. Мельникова, В.В. Гречко, Б.М. Медников // Генетика.-1995.-Т.31, № 8.-С.1120-1131.
2. Левонтин Р. Генетические основы эволюции /Р. Левонтин. – М.: Мир.: 1978.-351с.
3. Суходолец В.В. Биологический прогресс и природа генетических рекомбинаций /В.В.Суходолец.-М.: Наука, 1995.-156с.

УДК 636.4.082.12.

Ганченкова Т.Б., Калашникова Л.А, Хабибрахманова Я.А.
ФГБНУ ВНИИплем, Московская область

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЭСТРОГЕНОВОГО, ПРОЛАКТИНОВОГО И РИАНОДИНОВОГО РЕЦЕПТОРОВ У СВИНЕЙ

Ключевые слова: свиньи, крупная белая порода, дюрок, ландрас, йоркшир, ДНК-маркер; ген эстрогенового рецептора (ESR); ген пролактинового рецептора (PRLR); ген рианодинового рецептора (RYR1).

Введение. Открытия в области молекулярной генетики позволили выделить участки генома, которые влияют на продуктивные и

воспроизводительные признаки свиней. Маркирование признаков продуктивности по главным генам продуктивности способствует ускорению селекционного процесса и повышению его эффективности. Животные, имеющие желательные ДНК-маркеры, могут быть отобраны для использования в программах маркерной селекции.

ДНК-маркирование оказалось перспективным для признаков, имеющих низкую наследуемость и проявления, ограниченные полом, – таких, как репродуктивные признаки. Многие исследования направлены на изучение генов, влияющих на эти характеристики. Гены эстрогенового (ESR) и пролактинового (PRLR) рецепторов признаны генами-кандидатами, влияющими на размер гнезда.

Одним из основных направлений в свиноводстве является селекция на мясные качества. Ген рианодинового рецептора (RYR1) – главный ген стресса, качества мяса и мясных кондиций свиней. Мутация в этом гене ведет к заболеванию свиней – злокачественному гипертермическому синдрому и появлению животных с плохим качеством мяса – бледное, экссудативное, мягкое. Поэтому при создании новых типов и линий свиней необходим молекулярно-генетический контроль гена RYR1 для снижения потерь мяса при его получении и обработке. Повышенная чувствительность к стрессам негативно отражается также и на сохранности молодняка.

Цель исследования. С помощью ДНК-диагностики определить полиморфизм генов RYR1, ESR и PRLR у свиней пород крупная белая, ландрас, йоркшир и дюрок.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

1. Генотипировать животных по генам RYR1, ESR, PRLR с помощью ПЦР-диагностики.
2. Определить частоту встречаемости аллелей и генотипов по генам RYR1, ESR, PRLR.

Материалы и методы исследования. Анализы ДНК проведены в лаборатории ДНК-технологий ФГБНУ ВНИИ племенного дела. В качестве объекта исследований были использованы свиноматки и хряки-производители пород ландрас, йоркшир, дюрок и крупно-белой породы, разводимые в ООО «Восточный» Завьяловского района Удмуртской республики.

Методом ПЦР-ПДРФ изучен полиморфизм генов ESR, PRLR и RYR1 у 219 маток и у 109 хряков-производителей.

ДНК экстрагировали из проб ткани свиней общепринятыми методами. В качестве основы для проведения ПЦР-ПДРФ анализа использованы методики Short T.H. et al. [7], Linville R.C. [6], Брема Г. и Бренинга Б. [1], обеспечивающие оптимальную амплификацию участков генов.

Для рестрикции амплифицированных участков генов ESR, PRLR и RYR1 использовали эндонуклеазы: PvuII, AluI, и HinfI, соответственно. Длину и число полученных фрагментов рестрикции определяли электрофоретически в 4%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия в ультрафиолетовом свете. Результаты распределения рестрикционных фрагментов ДНК фиксировали на оптическое компьютерное устройство. Частоты генотипов и

аллелей, а также генетическое равновесие в популяции маток и хряков-производителей данных пород рассчитывали по Е.К. Меркурьевой [3].

Результаты исследования: В ходе молекулярно-генетического тестирования основных свиноматок и хряков-производителей породы дюрок, ландрас, йоркшир и крупно-белой породы, был выявлен полиморфизм генов ESR, PRLR и RYR1.

Исходя из полученных данных о полиморфизме гена ESR, были рассчитаны частоты аллелей и генотипов (табл. 1).

В зависимости от породной принадлежности животных наблюдается различная частота аллелей и генотипов. В результате проведенного анализа в трех породах – крупная белая, йоркшир и ландрас были обнаружены два аллеля – А и В гена ESR, т.е. животные этих пород оказались полиморфными по данному гену. В породе дюрок полиморфизма не выявлено – все животные являются носителями гомозиготного генотипа АА, желательный аллель В отсутствует.

Таблица 1 Генетическая структура пород свиней по гену ESR

Порода	Пол	Число голов	Частота генотипов, %			Частота аллелей	
			АА	АВ	ВВ	А	В
Крупная белая	хряки	5	0	60.0	40.0	0.30	0.70
	матки	70	20.0	50.0	30.0	0.45	0.55
Йоркшир	хряки	28	25.0	57.1	17.9	0.54	0.46
	матки	44	43.2	50.0	6.80	0.68	0.32
Ландрас	хряки	31	90.3	6.50	3.20	0.94	0.06
	матки	42	90.5	9.50	0	0.95	0.05
Дюрок	хряки	45	100	0	0	100	0.00
	матки	63	100	0	0	100	0.00
Всего		328					

Частота аллеля А по данным породам варьирует от 1 до 0.30, а частота аллеля В от 0.70 до 0.05. Наибольшая частота аллеля А выявлена у свиней породы дюрок – 1,0. Животные породы ландрас по этому показателю близки к породе дюрок – частота встречаемости аллеля А составляет у них 0,95. Частота аллеля А в породе йоркшир составляет от 0.54 до 0,68, что почти в полтора раза выше, чем в крупно белой породе (0,30 - 0,45).

Частота встречаемости аллеля желательного аллеля В оказалась наибольшей в крупно белой породе (0,55 - 0,70), отличающейся многоплодием. В породе дюрок аллель В выявлен не был. В породе ландрас доля аллеля В крайне мала и составляет всего 0,05 – 0.06. Частота аллеля В у йоркширов составила от 0,32 до 0.46.

Значения частот генотипов также различаются в зависимости от породы. В целом из 328 генотипированных животных 214 голов имеет генотип АА, 82

головы – генотип АВ и 32 головы – ВВ. Наблюдается преобладание животных с генотипом АА – их почти в 6,5 раз больше, чем носителей генотипа ВВ и примерно в 2,5 раза больше, чем АВ. Частота генотипа АА составляет 90 % в породе ландрас и 100 % в породе дюрок. Наиболее меньший процент генотипа АА наблюдается у животных крупной белой породы и составляет 20 %. В породе йоркшир частота генотипов варьирует от 25 до 43 %.

Наибольшее количество животных с гомозиготным желательным генотипом ВВ (23 головы) было выявлено в группе свиней крупно белой породы. У животных породы дюрок генотип ВВ не был обнаружен. Редко встречается генотип ВВ и среди свиней породы ландрас и йоркшир– его частота в данных породах составляет от 0.03 до 17.9 %. Полученные нами результаты по частоте встречаемости аллеля В гена ESR (0,05-0,70) в целом совпадают с данными (0,02-0,77) других авторов Калашниковой Л.А. Лаломовой Е.В.[2], Епишко О. А.[4]

Частоты встречаемости генотипов и аллелей по гену PRLR в популяциях маток и хряков-производителей вышеуказанных пород распределились следующим образом (табл. 2).

Таблица 2 Генетическая структура пород свиней по гену PRLR

Порода	Пол	Число голов	Частота генотипов, %			Частота аллелей	
			АА	АВ	ВВ	А	В
Крупная белая	хряки	5	0.00	100	0.00	0.50	0.50
	матки	70	15.7	74.3	10.0	0.53	0.47
Йоркшир	хряки	28	14.3	57.1	28.0	0.43	0.57
	матки	44	15.9	65.9	18.2	0.49	0.51
Ландрас	хряки	31	19.4	41.9	38.7	0.40	0.60
	матки	42	14.3	59.5	26.2	0.44	0.56
Дюрок	хряки	45	20.0	48.9	31.1	0.44	0.56
	матки	63	4.80	31.7	63.5	0.21	0.79
Всего		328					

Во всех четырех породах были обнаружены два аллеля гена PRLR – А и В, а также три генотипа АА, АВ и ВВ. Наблюдались различная частота аллелей в зависимости от породы. Частота аллеля В во всех породах превышала отметку 0.50 и варьировала от 0.50 до 0.79, за исключением маток крупно белой породы, концентрация аллеля В в данной группе составила 0.47. Частота желательного аллеля А у свиней данных пород варьировала от 0.21 до 0.53. Наибольшая частота аллеля А отмечена у в группе маток крупной белой породы и составляет 0.53.

Частоты генотипов также варьируют в зависимости от породы. Наибольшая доля гомозиготных по аллелю А животных наблюдается в группе хряков пород дюрок (20%) и ландрас (19.4%). Частота гомозиготного генотипа АА у животных йоркшир и крупно белой породы находится приблизительно на одном уровне и составляет соответственно 15.9% и 15.7% у маток и 14.3% у

хряков. У хряков крупной белой породы генотип АА не обнаружен. Наименьшая доля генотипа АА выявлена в группе маток породы дюрок и составляет 4,8%.

Доля гетерозиготного генотипа АВ в изучаемых породах наиболее высока и варьирует от 31,7% до 100%. Самая большая концентрация гетерозиготного генотипа АВ достигнута у животных крупной белой породы и составляет 74,3% у хряков и 100% у свиноматок. В породах йоркшир и ландрас частота гетерозигот колеблется от 41,9 до 65,9%. Меньшая доля генотипа АВ выявлена у свиноматок породы дюрок и составляет 31,7%.

В исследуемых группах свиней имеются значительные различия частот гомозиготного генотипа ВВ. Частота встречаемости генотипа ВВ варьирует от 10 до 63,5%. Наименьшая доля генотипа ВВ наблюдается у свиноматок крупной белой породы и составляет 10%, в группе хряков данной породы животных с генотипом ВВ не выявлено. Наиболее высокая концентрация генотипа ВВ гена PRLR обнаружена в группе свиноматок породы дюрок 63,5%. В группах хряков производителей породы ландрас и йоркшир частота генотипа ВВ в 1,5 раза превышает таковую величину в группах свиноматок данных пород. По данным зарубежных исследователей Isler B.J et al. [5], Kmiec M. et al. [8, 9] частота аллеля А гена PRLR в зависимости от породы свиней варьирует от 0,19 до 0,58. Наши данные находятся в пределах указанного диапазона изменчивости показателя.

В результате тестирования исследуемых пород по гену RYR1 диагностировано наличие двух генотипов NN и Nn и выявлено два аллеля N и n. (табл. 3)

Таблица 3 Генетическая структура пород свиней по гену RYR1

Порода	Пол	Число голов	Частота генотипов, %			Частота аллелей	
			NN	Nn	nn	N	n
Крупная белая	хряки	5	100	0	0	1,00	0,00
	матки	70	99	1	0	0,99	0,01
Йоркшир	хряки	28	100	0	0	1,00	0,00
	матки	44	100	0	0	1,00	0,00
Ландрас	хряки	31	100	0	0	1,00	0,00
	матки	42	95	5	0	0,98	0,02
Дюрок	хряки	45	100	0	0	1,00	0,00
	матки	63	100	0	0	1,00	0,00
Всего		328					

Среди свиноматок крупной белой породы и ландрас было обнаружено несколько особей, имеющих мутантный аллель в гетерозиготном состоянии. Скрытыми носителями этого аллеля являлись 3 свиноматки. Частота встречаемости аллеля n у свиней крупной белой породы составила 0,01 и у свиней породы ландрас 0,02. В породах йоркшир и дюрок мутантный аллель выявлен не был.

Среди хряков-производителей во всех исследуемых породах мутантный аллель гена RYR1, связанный с чувствительностью к стрессфакторам, не обнаружен. Следует отметить, что на данном племпредприятии все хряки-производители регулярно проходят тщательный генетический контроль на наличие генетических аномалий методами ДНК-диагностики.

Выводы.

1. Частота желательного аллеля В гена ESR наиболее высока у свиней крупной белой породы и достигает у хряков 0,70, у маток 0,55. Частота генотипов ESR, имеющих аллель В, в сумме достигает у хряков крупной белой породы 100% и у маток 80%. У йоркширов частота аллеля В ниже: у хряков – 0,46, у маток – 0,32. У свиней пород ландрас частота аллеля В не превышает 0,06, у свиней породы дюрок аллель В не выявлен.
2. Желательный аллель А гена PRLR преобладает у свиней крупной белой породы (0,50 – 0,53). У свиней пород йоркшир, ландрас и дюрок преобладает аллель В гена PRLR с частотой от 0,51 до 0,79.
3. У хряков-производителей мутантный аллель гена RYR1 не выявлен. У маток крупной белой породы и ландрас частота мутантного аллеля составила от 0,01 до 0,02, частота встречаемости скрытых носителей мутации от 1% до 5%.
4. Выявлены различия частоты встречаемости аллелей и генотипов исследуемых генов у хряков и маток, обусловленные, вероятно, селекционным давлением и отбором поголовья с учетом результатов генетической экспертизы.

Библиографический список

1. Брэм, Г. Использование в селекции свиней молекулярной генной диагностики злокачественного гипертермического синдрома (MHS) / Г. Брэм, Б. Бренинг // Генетика. – 1993. – Т. 29, № 6. – С. 1009-1013.
2. Калашникова Л.А., Лаломова Е.В., Полиморфизм генов пролактинового и эстрогенового рецепторов у свиней крупной белой породы // В сб. «Актуальные проблемы биологии в животноводстве», Боровск, 2006, с.249
3. Меркурьева, Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве / Е.К. Меркурьева // – М. : Колос, 1977. – С. 98-103.
4. Епишко О. А. Генетическая структура белорусской мясной породы свиней по генам ESR, PRLR, FSH β и RYR1 / О. А. Епишко // От классических методов генетики и селекции к ДНК-технологиям : материалы междунар. науч.-конфер., 2-5 октября 2007. – Минск, 2007. – С 86.
5. Isler B.J., Irvin K.M., Rothschild M.F., Evans G.J. Examination of the relationship between the prolactin receptor gene and reproductive tract components in swine // The Ohio State University Department of Animal Sciences. Research and Reviews. – 2001. – P.83-86.
6. Linville R.C., Pomp D., Jonson R.K., Rothschild M.F. Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine // J. Anim. Sci. - 2001. - 79. - P.60-67.
7. Short T. H., Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines // J. Anim. Sc. – 1997. – Vol. 75, N 12. – P. 3138–3142.

8. Kmiec M., Terman A. Assotiations between the prolactin receptor gene polimorhisin and reproductive traits of boars // J.Appl. Genet.- 2006.- 47 (2)-P.139-141.

9. Kmiec M., Terman A. Polimorhisin the PRLR/AluI gene and its effect on litter size in Large White sows // Anim. Sci. Papers and Reports–2004.-22-№4.– P.523-527.

УДК 636.2.082.2.(470.57)

Гареева И.Т.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ПРОЛАКТИНА И β -ЛАКТОГЛОБУЛИНА С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КОРОВ ЧЁРНО-ПЁСТРОЙ ПОРОДЫ

Ключевые слова: ген; полиморфизм; β -лактоглобулин; пролактин; крупный рогатый скот; молочная продуктивность.

Введение. В наступившем XXI веке эффективность селекции во многом будут определять новые методы молекулярной генетики [3]. Главная задача специалистов-животноводов состоит в том, чтобы выявить и полнее использовать биологические закономерности и возможности организма животного для получения максимума продукции. Приоритетными исследованиями в области скотоводства является освоение интенсивных технологий производства высококачественного молока. К интенсивным технологиям можно отнести совершенствование пород крупного рогатого скота с использованием ДНК-технологий в генотипировании животных. Суть его заключается в поиске и анализе генов, позволяющих маркировать локусы количественных признаков (хозяйственно-полезных признаков) и вести отбор с помощью маркеров («маркер-зависимая селекция»). Возможность определения генотипа животного в раннем возрасте, независимо от пола и физиологического состояния является главным преимуществом ДНК-технологий. Геномная селекция – новый инструмент, дающий возможность наиболее точно рассчитать племенную ценность животного и ускорить селекционный прогресс [2; 4].

Значительный интерес для молочного животноводства представляют гены β -лактоглобулина (LGB) и пролактина (PRL). Ген LGB влияет на жирность молока, отвечает за белковомолочность и показатель биологической ценности молока [1; 5].

Во многих исследованиях также выявлена связь различных полиморфных вариантов PRL с хозяйственно-полезными признаками: ростом, молочной продуктивностью, содержанием белка и жира в молоке [6; 7].

В последние годы появилось много работ по ДНК-диагностике, но несмотря на это, оценка по генетическим маркерам не нашла широкого использования в селекционной практике. Поиск, совершенствование и

использование новых маркеров для отбора высокопродуктивных животных являются актуальной проблемой животноводства.

Материалы и методы исследования. Материалом исследований служили выборки коров чёрно-пёстрой породы из трех хозяйств: СПК ПЗ «Ленина» (выборка 1; n=82), ООО АП им. Калинина (выборка 2; n=455) и СПК «Красная Башкирия» (выборка 3; n=115) Республики Башкортостан.

Данные о молочной продуктивности коров получены из племенных карточек 2МОЛ непосредственно в хозяйстве. ДНК из крови выделяли по стандартному фенол-хлороформному методу.

Методом ПЦР-ПДРФ были генотипированы полиморфные варианты гена пролактина и β -актоглобулина. Рестрикты разделяли электрофорезом в 7% ПААГ-геле, анализировали с помощью компьютерной системы геледокументирования Gel Doc XR.

Статистическую обработку данных генотипирования проводили по стандартным методикам, с использованием программы Microsoft Excel, Statistica for Windows в версии 5.1.

Результаты исследования. Результаты анализа распределения аллелей и генотипов гена пролактина в исследованных выборках коров представлены в таблице 1.

Как следует из таблицы 1, наибольшие частоты у коров чёрно-пёстрой породы (усредненное значение) отмечались для аллеля PRL^A (0,86) и генотипа PRL^{AA} (74,8%).

Таблица 1 Распределение частот аллелей и генотипов гена PRL у коров чёрно-пёстрой породы

Порода	Популяция*	N	Частота генотипов, %			Частота аллелей		χ^2
			PRL^{AA}	PRL^{AB}	PRL^{BB}	PRL^A	PRL^B	
Чёрно-пёстрая	1	72	76,4	19,4	4,2	0,86±0,03	0,14±0,03	4,61
	2	453	79,2	19,8	1	0,89±0,01	0,11±0,01	0,21
	3	115	68,7	27,8	3,5	0,83±0,03	0,17±0,03	0,37
	В целом	640	74,8	22,3	2,9	0,86±0,01	0,14±0,01	-

Примечание: *- популяция 1 – чёрно-пёстрая порода СПК ПЗ «Ленина»; 2 – чёрно-пёстрая порода ООО АП им. Калинина; 3 – чёрно-пёстрая порода СПК «Красная Башкирия».

У изученных пород коров в целом достоверно сохраняется генное равновесие по локусу пролактина.

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов гена LGB в выборках различных пород коров представлен в таблице 2.

Во всех выборках преобладают особи с гетерозиготным генотипом LGB^{AB} , их процентное соотношение в каждой выборке составляет более 50%. В основном, в исследованных популяциях преобладает аллель LGB^B .

Методом χ^2 -квадрат провели оценку соответствия фактически наблюдаемых частот генотипов в изученных выборках теоретически

ожидаемым в соответствии с законом Харди-Вайнберга. В выборке чёрно-пёстрой породы ООО АП им. Калинина высокое значение χ^2 (21,66) получено за счет избытка гетерозигот (267 наблюдаемых против 218,8 ожидаемых) и недостатка гомозигот. Остальные выборки находятся в равновесном состоянии.

Для изучения ассоциаций выявленных аллелей генов PRL и LGB с показателями продуктивности животных проведен анализ взаимосвязи средних удоев за первую лактацию, содержания молочного жира и белка.

Из данных таблицы 3 следует, что в двух выборках чёрно-пёстрой породы наибольшей величиной удоев обладают особи с генотипом PRL^{BB} (СПК ПЗ «Ленина» - 4382,3±387,5 кг; СПК «Красная Башкирия» - 4511,7±142,6 кг).

Таблица 2 Распределение частот аллелей и генотипов гена LGB у коров чёрно-пёстрой породы

Порода	Популяция*	N	Частота генотипов, %			Частота аллелей		χ^2
			LGB ^A _A	LGB ^{AB}	LGB ^{BB}	LGB ^A	LGB ^B	
Чёрно-пёстрая	1	82	7,4	58,5	34,1	0,37±0,0 4	0,62±0,0 4	5,6
	2	444	13,7	60,1	26,1	0,44±0,0 2	0,56±0,0 2	21,5
	3	99	8,1	51,5	40,4	0,34±0,0 3	0,66±0,0 3	2,1
	В целом	625	9,8	56,7	33,5	0,38±0,0 1	0,62±0,0 1	-

Примечание: * - популяция 1 – чёрно-пёстрая порода СПК ПЗ «Ленина»; 2 – чёрно-пёстрая порода ООО им. Калинина; 3 – чёрно-пёстрая порода СПК «Красная Башкирия».

Наименьшую величину удоев имеют особи с генотипом PRL^{AA}: в подвыборке коров из СПК ПЗ «Ленина» (3808,7±77,1 кг), а во второй популяции – 4177,1±82,4 кг. Особи с генотипом PRL^{BB} также показали наивысший выход молочного жира. В СПК «Красная Башкирия» по массовой доле жира коровы с генотипом PRL^{AA} преобладали над особями с генотипом PRL^{BB} (P<0,001). У коров чёрно-пёстрой породы ООО АП им. Калинина животные генотипа PRL^{AB} (4829,6±85,1 кг) показали наивысший удой за лактацию, им уступили животные с генотипом PRL^{BB} (P<0,05). По выходу молочного жира особи с генотипами PRL^{AA} и PRL^{AB} имели преимущество над особями PRL^{BB}, разница между ними составила 22,5 кг (P<0,05) и 29,7 кг (P<0,01).

В таблице 4 представлены показатели молочной продуктивности коров изученных пород с различными генотипами по гену LGB.

Из данных таблицы 4 следует, что в выборках СПК «Красная Башкирия» и ООО АП им. Калинина достоверно более высокими надоями и выходом молочного жира характеризуются коровы с генотипами LGB^{AB} и LGB^{BB}.

Различия в их пользу в СПК «Красная Башкирия» по сравнению с генотипами LGB^{AA} составляет 697,9 кг и 606,8 кг соответственно (P<0,05) и 27,7 кг и 24,9 кг по молочному жиру (P<0,05). В ООО АП им. Калинина различия между генотипами LGB^{AB} и LGB^{AA} по удою и молочному жиру составили соответственно 209,4 кг (P<0,05) и 8,1 кг, а между генотипами LGB^{BB} и LGB^{AA} – 206,6 кг (P<0,05) и 8,1 кг (P<0,05).

Таблица 3 Молочная продуктивность коров чёрно-пёстрой породы с различными генотипами по гену PRL

Показатель	Генотип			Разница		
	PRL ^{AA}	PRL ^{AB}	PRL ^{BB}	AA-AB	AA-BB	BB-AB
СПК «Красная Башкирия»						
Удой, кг	4177,1±82,4	4282,6±109,2	4511,7±142,6	105,5	334,6*	229,1
Жир, %	3,83±0,024	3,80±0,037	3,68±0,029	0,02	0,15***	0,12
Молочный жир, кг	160,4±3,52	163,1±4,64	166,1±4,51	5,6	6,7	1,1
Белок, %	3,3±0,02	3,27±0,01	3,2±0,07	0,03	0,1	0,07
ООО АП им. Калинина						
Удой, кг	4671,3±34,3	4829,6±85,1	4205,4±310,1	158,3	466	624*
Жир, %	3,94±0,01	3,97±0,02	3,86±0,08	0,03	0,08	0,11
Молочный жир, кг	184,4±1,46	191,6±3,41	161,9±9,5	7,2	22,5*	29,7**
Белок, %	3,25±0,005	3,26±0,011	3,29±0,046	0,01	0,04	0,03
СПК ПЗ «Ленина»						
Удой, кг	3808±77,1	4123,6±116,5	4382,3±387,5	315,6	574,3	258,7
Жир, %	3,74±0,004	3,74±0,007	3,75±0,012	0	0,01	0,01
Молочный жир, кг	142,9±2,85	153,3±4,52	164,4±14,08	10,4	21,5	11,1
Белок, %	3,25±0,01	3,23±0,02	3,28±0,04	0,02	0,03	0,05

Примечание: * - P < 0,05; ** - P < 0,01; *** - P < 0,001

В СПК ПЗ «Ленина» достоверных различий в показателях молочной продуктивности между коровами различных генотипов не выявлено.

У коров чёрно-пёстрой породы по содержанию белка достоверных различий между генотипическими группами не обнаружено.

Вывод. Установлена общая тенденция взаимосвязи генотипов по гену PRL с молочной продуктивностью у коров чёрно-пёстрой породы, которую можно представить следующим образом: PRL^{BB}>PRL^{AB}>PRL^{AA}. Описанное

соотношение характерно как для величины удоев, так и для количества молочного жира.

Коровы чёрно-пёстрой пород, несущие в своем генотипе аллель гена LGB^B как в гетерозиготной, так и в гомозиготной формах имеют достоверно более высокие надои и выход молочного жира.

Таблица 4 Молочная продуктивность коров чёрно-пёстрой породы с различными генотипами по гену LGB

Показатель	Генотип			Разница		
	LGB ^{AA}	LGB ^{AB}	LGB ^{BB}	AA-AB	AA-BB	BB-AB
СПК «Красная Башкирия»						
Удой, кг	3578,6±254	4276,5±98	4185,5±106	697,9*	606,8*	91,1
Жир, %	3,76±0,06	3,83±0,03	3,83±0,03	0,07	0,07	0
Молочный жир, кг	135,3±11,1 1	163,0 ± 4,09	160,2 ± 4,39	27,7*	24,9*	2,8
Белок, %	3,24±0,05	3,29±0,03	3,29±0,04	0,05	0,05	0
ООО АП им. Калинина						
Удой, кг	4515,7±76, 5	4725,1±70, 7	4722,3±41, 1	209,4*	206,6*	2,8
Жир, %	3,95±0,25	3,94±0,01	3,94±0,12	0,01	0,01	0
Молочный жир, кг	178,4±3,2	186,5±2,9	186,5±1,7	8,1	8,1*	0
Белок, %	3,48±0,03	3,44±0,03	3,44±0,02	0,04	0,04	0
СПК ПЗ «Ленина»						
Удой, кг	4016,8±200	3974,7±80	3838,9±88, 7	42,1	178	135,8
Жир, %	3,72±0,01	3,74±0,00	3,73±0,01	0,02	0,01	0,01
Молочный жир, кг	149,6±7,78	148,8±2,3	143,8±3,34	0,8	6,3	5
Белок, %	3,22±0,0	3,24±0,0	3,21±0,0	0,02	0,01	0,03

Примечание: * - P<0,05;

Библиографический список

1. Гладырь, Е.А. Использование генов бета-лактоглобулина и каппа-казеина в качестве генетических маркеров для крупного рогатого скота / Е.А. Гладырь, Н.А. Зиновьева, Н.С. Марзанов, Г. Брем // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: мат. 2-й межд. науч. конф. М.: ВНИИСХБ. - 2000. – С. 86-88.

2. Глазко, В.И. ДНК-технологии животных / В.И. Глазко - Киев: Нора-принт, 1997. – 173с.

3. Завертяев, Б.П. Краткий словарь селекционно-генетических терминов в животноводстве / Б.П. Завертяев. – М.: Россельхозиздат, 1983.- 108 с.

4. Зиновьева, Н.А. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н.А.Зиновьева, Е.А. Гладырь, Л.К. Эрнст, Г. Брем. – Дубровицы, 2002. -112 с.

5. Калашникова, Л.А. Влияние полиморфизма генов молочных белков и гормонов на молочную продуктивность коров черно-пестрой породы / Л.А. Калашникова, Я.А. Хабибрахманова, А.Ш. Тинаев // Доклады РАСХН. – 2009. - № 3. –С. 49-52.

6. Удина, И. Г. Полиморфизм гена пролактина (микросателлиты, ПЦР-ПДРФ) у крупного рогатого скота / И.Г.Удина, С.О. Туркова, М.В. Костюченко, Л.А. Лебедева, Г.Е. Сулимова // Генетика. -2001. -Т.37. -№4. -С. 511-516.

7. Lewin, H.A. Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing / H.A. Lewin, K. Schmitt, R. Hubert, M.J. Van Eijk, N. Arnheim // Genomics. - 1992. – V. 13. – P. 44-48.

УДК 636.036.1

Герасимова Л.В., Янбаев Ю.А.

ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСА LDH-1 И КАЧЕСТВО ВОЛОСЯНОГО ПОКРОВА У АМЕРИКАНСКИХ НОРОК

Ключевые есть: американская норка, Mustela vison L., аллозимы, количественные признаки, лактатдегидрогеназа, полиморфизм, изоферменты, качество опушения

Развитие методов биологических исследований предоставляет большие возможности для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных, в том числе для увеличения эффективности пушного звероводства [1]. Целью данной работы является изучение у американских норок (*Mustela vison* L.) связи полиморфизма изоферментного локуса *Ldh-1*, контролирующего синтез фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27.) и одного из важнейших признаков качества волосяного покрова – его опушения.

В работе исследованы норки породы стандартная тёмно-коричневая Иглинского зверохозяйства Республики Башкортостан. Кровь брали в период убоя у молодняка поголовьем в 313 голов. Баллы за опушение у подопытных норок проставлялись при бонитировке по 5-бальной шкале (табл.) согласно ОСТ 10 10-86 [2]. Для характеристики полиморфизма изоферментного локуса *Ldh-1* использован полиакриламидный диск-электрофорез в щелочном геле. Детальное описание использованных методик исследований приведено ранее [3].

После гистохимического окрашивания гелей обнаружены пять зон активности фермента. Их генетическая интерпретация уже представлена в научной литературе [1]. В области с наибольшей электрофоретической подвижностью выявлены три фенотипа аллозимов, два из которых однополосные, а один – трехполосный. Они соответствуют гомозиготным

генотипам Ldh-1^{2/2} (290 особей) и Ldh-1^{1/1} (1), а также гетерозиготе Ldh-1^{1/2} (22). Частоты аллелей 1 и 2 составили 0,073 и 0,927 соответственно. Наблюдаемая гетерозиготность локуса меньше ($H_o=0,070$), чем ожидаемая ($H_E=0,135$). Несмотря на то, что животные в течение многих поколений подвергались искусственному отбору, фактические частоты всех трех генотипов статистически достоверно соответствовали теоретически ожидаемым их распределениям – правило Харди-Вайнберга в объединенной выборке не нарушено.

Таблица 1. Распределение генотипов норок по выраженности качества волосяного покрова

Балл	Характеристика качества волосяного покрова	Распределение генотипов, %	
		Ldh-1 ^{2/2}	Ldh-1 ^{1/2}
5	Очень густой, уравненный, шелковистый	13,46	18,19
4	На животе и боках допускается более редкая ость	40,11	45,45
3	Менее густой, на боках просвечивает пух	35,71	27,27
2	Не густой, ость редковатая, пух на спине и боках просвечивает	10,44	9,09
1	Не удовлетворяет требованиям 2-5 баллов	0,27	0

Для норок с генотипами Ldh-1^{1/2} балл опушения 1 не проставлен, в другой группе выявлена одна такая особь. Анализ распределения по данному параметру (табл.) показывает, что в первой выборке чаще встречаются норки с лучшими (4 и 5) баллами – суммарно 63,64 против 53,57 % в сравниваемой группе. Менее ценные в этом отношении баллы 3 и 2 чаще проставлены для генотипа Ldh-1^{2/2} (46,15 % против 36,36 %). В связи с различиями в объемах выборок нами оценена степень статистической достоверности их различий по опушенности. Установлено, что средние арифметические баллы ($3,54 \pm 0,052$ для гомозигот и $3,86 \pm 0,18$ – для гетерозигот) отличаются на очень высоком уровне значимости $P < 0,001$. Генотипы Ldh-1^{1/2} более однородны по выраженности опушения (коэффициент вариации 21,6 % против 24,9 % у особей с генотипом Ldh-1^{2/2}). Таким образом, норки с генотипами Ldh-1^{2/2} имеют худшее опушение, по сравнению с гетерозиготами. Единственная гомозигота Ldh-1^{1/1} также характеризуется низким баллом 4.

Возможны два основных объяснения феномена лучшего опушения норок, гетерозиготных по локусу Ldh-1. Наличие у таких особей одновременно двух изоферментов, обладающих разными физико-химическими свойствами, может предоставить им селективные преимущества, расширить диапазон адаптивных реакций. Эта тема в научной литературе широко обсуждалась [1]. Другое возможное объяснение, не исключающее первое, – снижение у гетерозигот

инбредной депрессии, присущей гомозиготным животным. При этом гетеро- или гомозиготность локуса Ldh-1 может отражать уровень инбридинга генома исследованных норок. В пользу данной версии выступает сравнительно высокое значение коэффициента инбридинга (индекса фиксации Райта) - $F = +0,481$.

Полученные нами результаты подтверждают мнение [1] о высокой перспективности использования полиморфизма аллозимных локусов в селекции американских норок. В этой связи представляется актуальным изучение связи других хозяйственно-важных показателей вида (пол и размер животных, окраска волосяного покрова и др.) с изменчивостью локуса Ldh-1 и использование полученных результатов в практике.

Библиографический список

1. Унжаков А.Р., Илюха В.А., Мацук Н.В. и др. Роль изоферментов лактатдегидрогеназы в адаптации млекопитающих Карелии // Экология. Экспериментальная генетика и физиология. Труды Карельского научного центра РАН. Вып. 1. Петрозаводск, 2007. С. 139-144.
2. ОСТ 10-10-86. Сельскохозяйственные животные. Пушные звери клеточного разведения. Зоотехнические требования при бонитировке (оценке). М.: Госагропром, 1986. 37 с.
3. Редькина Н.Н., Муллагулов Р.Ю., Янбаев Ю.А. и др. Высокая пространственная структурированность аллозимных генотипов в изолированной популяции дуба черешчатого *Quercus robur* L. (*Fagaceae*) // Генетика. 2008. Т. 44 . № 8. С. 1-3.

УДК 636.082.13(470.57)

Гумеров У.Р., Исламова С.Г.

ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ

АНТИГЕННЫЙ СОСТАВ ГРУПП КРОВИ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОРОДНОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Ключевые слова: антигены; группа крови; генетическое сходство; порода; маркеры.

В генетике все шире и глубже разрабатываются новые пути изучения закономерностей наследования количественных различий между признаками не по прямым, а по косвенным показателям. К числу таких маркеров относятся, прежде всего хромосомы, группы крови, полиморфные белки крови, молока и других биологических жидкостей.

Из всех известных физиолого-биохимических показателей частота генов групп крови является главным популяционно-генетическим параметром, позволяющим дать количественную оценку происходящего генетического

процесса в популяциях. В связи с этим наиболее простым и доступным методом выявления генетических различий (сходств) между породами, линиями является сравнение частот отдельных антигенов групп крови

По результатам иммуногенетических исследований нами проведена аттестация быков-производителей ОАО «Башкирское» по племенной работе и изучен аллелофонд их групп крови. Всего исследовали 33 быка симментальской породы и их помесей с голштинами.

Исследования показали, что антигенный состав эритроцитов крови быков разного происхождения оказался довольно широким. У них обнаружены существенные различия по частоте встречаемости антигенных факторов. У симментальских чистопородных быков-производителей частота встречаемости антигенных факторов составила (%): A_1 - 55,5, A_2 -55,5, B_1 -11,1, B_2 - 44,4, G_2 - 33,3, G_3 - 44,4, K - 11,1, I_1 - 11,1, I_2 - 11,1, O_1 - 22,2, O_2 - 22,2, O_3 - 22,2, O_x - 66,7, Q - 11,1, T_2 - 22,2, Y_2 - 22,2, E_2' - 33,3, E_3' - 44,4, G' - 22,2, I' - 55,5, Q' - 33,3, B'' - 22,2, G'' - 11,1, C_1 - 33,3, C_2 - 55,5, E - 66,7, R_1 - 1,1, R_2 - 33,3, W - 55,5, X_2 - 44,4, C' - 11,1, L' - 22,2, F - 100,0, V - 55,5, L - 33,3, S_1 - 33,3, S_2 - 33,3, H' - 88,9, H'' - 22,2 и Z - 55,5. Такие факторы, как P_2 , T_1 , Y_1 , A_1' , A_2' , B' , D' , J_2' , O' , P_2' , Y' , X_1 , J_1 , J_2 , M , U , U' , U'' у обследованных симментальских животных не обнаружены. У симментал × голштинских помесей частота встречаемости антигенных факторов составила: A_1 - 54,2, A_2 - 58,3, B_1 - 4,2, B_2 - 20,8, G_2 - 29,2, G_3 - 37,5, K - 12,5, O_1 - 25,0, O_2 - 33,3, O_3 - 37,5, O_x - 50,0, P_2 - 8,3, Q - 16,7, T_1 - 4,2, T_2 - 12,5, Y_1 - 25,0, Y_2 - 66,7, A_1' - 20,8, A_2' - 25,0, B' - 8,3, D' - 25,0, E_2' - 33,3, E_3' - 37,5, G' - 25,0, I' - 25,0, I' - 4,2, O' - 12,5, P_2' - 12,5, Q' - 41,7, Y' - 12,5, G'' - 4,2, C_1 - 33,3, C_2 - 62,5, E - 37,5, R_1 - 4,2, R_2 - 12,5, W - 33,3, X_2 - 66,7, L' - 4,2, F - 91,7, V - 20,8, J_1 - 4,2, J_2 - 4,2, Z - 8,3 %. Такие факторы как I_1 , I_2 , B'' , C' в крови животных этой группы не выявлены. А антигенные факторы X_1 , M , U'' , R' , S' не обнаружены в обоих случаях. Следует также отметить о том, что в наших наблюдениях одни факторы (Z' , G_1 , P_1 , F_1' , F_2' , J_1' , K' , P_1' , X_1 , M , U , SU 27, SU 29, SU 34) в той и другой группе животных ни разу не встречались, в то же время такие факторы как F присутствовали в 92...100 случаях. Также нами выявлено, что помесные (симментал × голштины) быки – производители имели более широкий спектр антигенного состава эритроцитов. Так, из 57 всех выявленных антигенных факторов помесные животные обладали 50 факторами, тогда как чистопородные быки имели только 39. Кроме того, присутствие таких антигенных факторов как P_2 , T_1 , Y_1 , A_1' , A_2' , B' , D' , J_2' , O' , P_2' , Y' , J_1 , J_2 , U , U' характерно в нашем случае только для помесных животных и, наоборот, факторы I_1 , I_2 , B'' , C' имелись только у чистопородных симментальских животных.

Таким образом, частота встречаемости отдельных антигенных факторов находилась в зависимости от генотипа производителей. Между тем, независимо от этого животных характерным является высокая (50...100%) частота встречаемости одних антигенных факторов (A_1 , A_2 , O_x , Y_2 , I' , C_2 , E , W , X_2 , F , V , H' , Z) и низкая или отсутствие других (I_1 , I_2 , P_2 , T_1 , B' , J_2' , X_1 , C' , J_1 , J_2 , M , U'' и др.).

Наши данные вполне подтверждают исследования С.Н. Скнарёва (2009). Автор выявил аллели, присущие голштинской породе американской, канадской и европейской селекции. К таким генетическим маркерам относятся $V_2O_2Y_2D'$, V_2G_2 . Исследованиями ряда авторов, в частности, Родионовым Г.В., Христенко В.Т. (2002), Кривенцовым Ю. и др. (2006), Романенко Г.А. (2009), были получены аналогичные результаты.

Рассчитав частоту встречаемости антигенов групп разных генотипов, можно определить их генетическое сходство и расстояние (таблица 1).

Таблица 1 Индексы генетического сходства (r) и генетической дистанции (d) быков производителей в связи с породной принадлежностью

Породность	Код	1	2	3	4
Симменталы чистопородные	1		$r=0,835$	$r=0,809$	$r=0,754$
Симментал х голштинские, 1/2	2	$d=0,165$		$r=0,871$	$r=0,741$
Симментал х голштинские, 5/8	3	$d=0,191$	$d=0,129$		$r=0,736$
Симментал х голштинские, 3/4	4	$d=0,246$	$d=0,259$	$d=0,264$	

По данным таблицы 3 видно, что наиболее высокое генетическое сходство установлено у чистопородных симментальских быков с полукровками (1/2 СхГ) по голштинской породе $r=0,835$, генетическая дистанция $d=0,165$. Генетическое сходство симментальских чистопородных быков с помесью снижается по мере возрастания их кровности по голштинской породе (на 0,055), а дистанция увеличивается в 1,3 раза. Наименьший индекс генетического сходства ($r=0,736$) выявлен между группами быков с 5/8 и 3/4 кровностью по голштинской породе.

Следует отметить, что самый высокий индекс генетического сходства ($r=0,871$) и, наоборот, самая маленькая генетическая дистанция ($d=0,129$) была отмечена между помесью с 1/2 и 5/8 кровностью по голштинской породе. Для наглядности представим данные в виде дендрограммы (рис. 1).

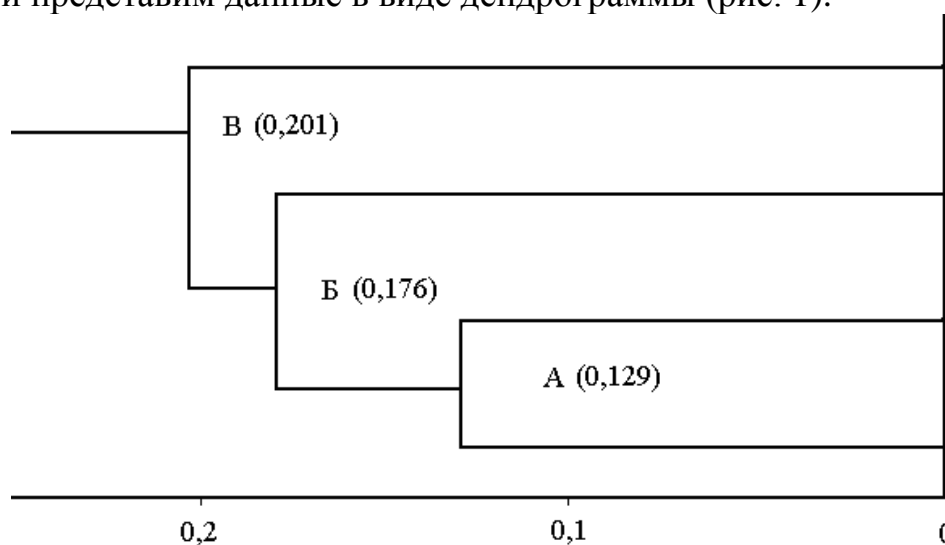


Рисунок 1 Дендрограмма генетических расстояний между группами быков-производителей различной породности

Кластер А объединил группы помесных быков-производителей с 1/2 и 5/8 кровностью по голштинской породе с генетической дистанцией 0,129. В точке 0,176 берет начало кластер Б – чистопородные животные. От кластера А на расстоянии 0,201 находится В-кластер – группа быков с 3/4 кровностью по голштинской породе.

Учитывая то, что чем генетически разнообразнее набор антигенных факторов, тем животные более приспособлены к меняющимся условиям среды обитания, устойчивы к заболеваниям и более продуктивны, целесообразно вести дальнейший отбор и подбор животных с учетом генетических систем групп крови.

Библиографический список

1. Родионов, Г. В. Экология и селекция сельскохозяйственных животных [Текст] : учеб. пособие / Г. В. Родионов, В. Т. Христенко. - М. : Агроконсалт, 2002. - 200 с.
2. Романенко, Г. А. Генетические маркеры в селекции Уральского черно-пестрого скота [Текст] / Г. А. Романенко // Аграрный вестник Урала. - 2009. - № 4. - С. 82-83
3. Скнарев, С.Н., Эколого-генетические аспекты разведения ярославского скота [текст] / автореф. канд. дисс. – М.: 2009. –С.14...17.
4. Кривенцов, Ю.М. Роль систем групп крови в селекции крупного рогатого скота [текст] / Ю.М.Кривенцов, С.Е.Тяпугин, О.Л.Хромова, О.Н.Бургомистрова / Зоотехния.- 2006.- №2.– С.9...11.

УДК 636. 082.12

Джапаридзе Г. М., Хабибрахманова Я. А., Калашникова Л. А.
ФГБНУ ВНИИплем, Московская область

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ CSN3, BLG, PRL, GH У ГОЛШТИНСКИХ КОРОВ

Ключевые слова: крупный рогатый скот, голштинская порода, ген, каппа-казеин, бета-лактоглобулин, пролактин, гормон роста, полиморфизм

Введение. В последнее время широко используются мировые генетические ресурсы для совершенствования отечественных пород скота. Особенно возросли масштабы генетического влияния голштинской породы, так как животные этой породы обладают наиболее высокой молочной продуктивностью, приспособленностью к промышленным технологиям и активно используются для улучшения других пород.

Крупный рогатый скот голштинской породы хорошо приспособляется к разным климатическим и хозяйственным условиям, корм полностью оплачивается молоком. Импортированное в Россию маточное поголовье голштинского скота планируется использовать в племенных целях.

При разведении пород крупного рогатого скота перспективным является изучение их генетической структуры на основе использования ДНК-технологий. Выявление предпочтительных вариантов главных генов продуктивности позволит дополнительно к традиционному отбору животных проводить селекцию по генотипу непосредственно на уровне ДНК. В качестве потенциальных маркеров молочной продуктивности могут рассматриваться аллели генов молочных белков и гормонов, непосредственно участвующих в регуляции лактации.

Цель настоящей работы – изучение полиморфизма генов каппа-казеина (CSN3), бета-лактоглобулина (BLG), пролактина (PRL) и гормона роста (GH) у импортированного маточного поголовья голштинского скота.

Материал и методы исследований. В лаборатории ДНК – технологий ФГБНУ ВНИИ племенного дела в 2011-2012 гг. были изучены генотипы коров одновременно по четырем генам CSN3, BLG, PRL, GH методом ПЦР-ПДРФ. Для проведения исследований были отобраны племенные чистопородные коровы голштинской породы черно-пестрой масти канадской селекции (n=129), завезенные в ЗАО «Рассвет» Рязанской области.

ДНК и крови животных выделяли общепринятыми методами. Для амплификации фрагментов генов использовали соответствующие праймеры, изготовленные ЗАО «Синтол», Россия:

CSN1: 5'-АТАGССАААТАТАТСССААТТСАГТ-3',

CSN2: 5'-ТТТАТТААТААГТССАТГААТСТТГ-3', [3];

BLG1: 5'-GTC-СТТ-GTG-СТG-GAC-ACC-GAC-TAC-A – 3',

BLG2: 5'-CAG-GAC-ACC-GGC-TCC-CGG-TAT-ATG-A-3', [6];

PRL1: 5'-CGAGTCСТТАТGAGCTTGATTCTT-3',

PRL2: 5'-GCСТТССАГААГТC GTTTGTTTTC-3', [7];

GH1: 5' TAGGGGAGGGGTGGAAAATGGA-3'

GH2: 5' GACACСТТАСТCAGACAATGCG-3' [4].

При проведении ПЦР (30 – 35 циклов) применяли следующие температуры отжига: CSN3 - 58°, LGB - 55°, PRL - 59°, GH - 60°C

Полученные амплификаты гена CSN3 расщепляли эндонуклеазой HindIII, гена LGB - HaeIII, гена PRL - RsaI, гена GH - AluI. Число и длину полученных фрагментов рестрикции определяли электрофоретически в 3% или 4%-ном агарозном геле в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием и анализировали с помощью компьютерной системы гель-документирования.

Результаты исследований. Анализ локуса гена каппа-казеина у 129 коров голштинской породы канадской селекции показал, что частота встречаемости желательного аллеля В, который ассоциируется с более высоким содержанием белка в молоке и лучшими технологическими свойствами молока, составляет 0,26. Высокая частота встречаемости аллеля А гена каппа-казеина является отличительной чертой голштинской породы. Коровы преимущественно представлены генотипами АА (54%) и АВ (41%), лишь 7% животных имеют генотип ВВ (таблица 1), хотя 15 лет назад канадские голштины имели ещё

меньше животных с генотипом ВВ: частота встречаемости генотипа АА у голштинского скота в Канаде составляла 75 %, гетерозиготного генотипа АВ – 23 %, гомозиготного генотипа ВВ – 2 % [8].

Таблица 1 Полиморфизм генов CSN3, BLG, PRL, GH

Гены	Число голов	Частота генотипов						Частота аллелей	
		АА		АВ		ВВ		А	В
		голов	%	голов	%	голов	%		
CSN3	129	69	54	53	41	7	5	0,740	0,260
BLG	129	17	13	67	52	45	35	0,391	0,609
PRL	129	85	66	42	32	2	2	0,822	0,178
		LL		LV		VV		L	V
GH	129	3	2	9	7	117	91	0,058	0,942

Полученные нами данные по распределению частот аллелей каппа-казеина по голштинской породе согласуются с полученными ранее [7, 9]. У 330 проанализированных быков-производителей голштинской породы, находящихся на отечественных племпредприятиях, средняя частота аллеля А составила 0,79, а частота аллеля В 0,21 [9]. В Великобритании у быков-производителей голштинской породы частота встречаемости аллельного варианта А составила – 0,80 и варианта В – 0,20 [7].

Анализ ДНК на наличие в геноме коров аллельных вариантов А и В гена бета-лактоглобулина показал, что в стаде преобладает гомозиготный генотип АВ 67%, генотип ВВ встречается у 35% коров (табл. 1). Благоприятный для молочной промышленности аллель В бета-лактоглобулина обнаруживается у большинства европейских пород крупного рогатого скота. В данном стаде коров голштинской породы частота аллеля А гена BLG составила 0,391, В – 0,609. В литературных источниках у коров голштинской породы также отмечено преобладание частоты аллеля В над аллелем А [1].

Была проведена ДНК-диагностика полиморфизма генов гормонов пролактина и соматотропина, у каждого выявлены два аллеля и три генотипа (табл. 1). Согласно полученным данным, две трети исследованных коров имеют генотип пролактина АА (85 голов или 66% поголовья), одна треть коров имеет генотип пролактина АВ (42 головы или 33% животных). Только у 2 коров выявлен гомозиготный генотип ВВ, что составляет всего 1,5% исследованного маточного поголовья. Встречаемость аллеля В у голштинского скота составила всего 0,178, что намного меньше, чем у отечественных пород скота [10, 11, 12].

Ген гормона роста у коров преимущественно представлен гомозиготным генотипом VV - 91%, генотип LV выявлен у 7% коров. Среди исследованных животных голштинской породы по гену гормона роста наблюдается значительное преобладание аллеля V 0,942.

Нами была определена генетическая структура маточного поголовья импортного голштинского скота одновременно по двум генам CSN3 и BLG, PRL и GH. Частота встречаемости комплексных генотипов каппа-казеина и бета-лактоглобулина приведена в таблице 2.

Таблица 2 Встречаемость комплексных генотипов каппа-казеина и бета-лактоглобулина

п/п	Комплексные генотипы CSN / BLG	Поголовье (n=129)	
		n	%
1	AA/AA	10	7
2	AA/AB	38	29
3	AA/BB	21	16
4	AB/AA	6	5
5	AB/AB	23	18
6	AB/BB	24	19
7	BB/AA	1	1
8	BB/AB	6	5
9	BB/BB	0	0

Из 9 теоретически возможных комплексных генотипов у исследуемого поголовья выявлено 8 генотипов. Не выявлен гомозиготный генотип CSN/BLG - BB/BB.

Оказалось, что наиболее часто – почти у трети импортных голштинских коров (29%) встречается комплексный генотип CSN / BLG - AA/AB, содержащий только 1 аллель В. Примерно с равной частотой встречаются генотипы CSN / BLG - AA/BB, AB/AB и AB/BB (16%, 18% и 19%, соответственно), имеющие 2 или 3 аллеля В в составе генотипа. Частота генотипов CSN / BLG AB/AA и BB/AB не превышает 5%.

Результаты анализа частоты встречаемости комплексных генотипов пролактина и соматотропина приведены в таблице 3.

Таблица 3 Встречаемость комплексных генотипов пролактина и соматотропина

п/п	Комплексные генотипы PRL / GH	Поголовье (n=129)	
		n	%
1	AA/LL	2	1,6
2	AA/LV	2	1,6
3	AA/VV	81	63
4	AB/LL	1	0,8
5	AB/LV	7	5,4
6	AB/VV	34	26
7	BB/LL	0	0
8	BB/LV	0	0
9	BB/VV	2	1,6

Из 9 теоретически возможных комплексных генотипов у исследуемого поголовья выявлено только 7 генотипов. Не выявлены генотипы PRL/GH - BB/LL и BB/LV.

Почти две трети импортных голштинских коров (63%) обладают комплексным генотипом PRL/GH - AA/VV, который является гомозиготным по аллелям обоих генов.

В исследованной группе коров (129 голов) выявлено 30 комплексных генотипов CSN/BLG/PRL/GH. Из них 12 генотипов имеют частоту менее 1% (рис. 1). Наиболее часто встречается генотип AAABAAVV (17%). Примерно с одинаковой частотой встречаются генотипы ABABAAVV (9,3%), AABBAAVV (10%), ABBBAAVV (10%), реже выявляются генотипы AAABABVV (5,4%) и ABBBABVV (5,4%).

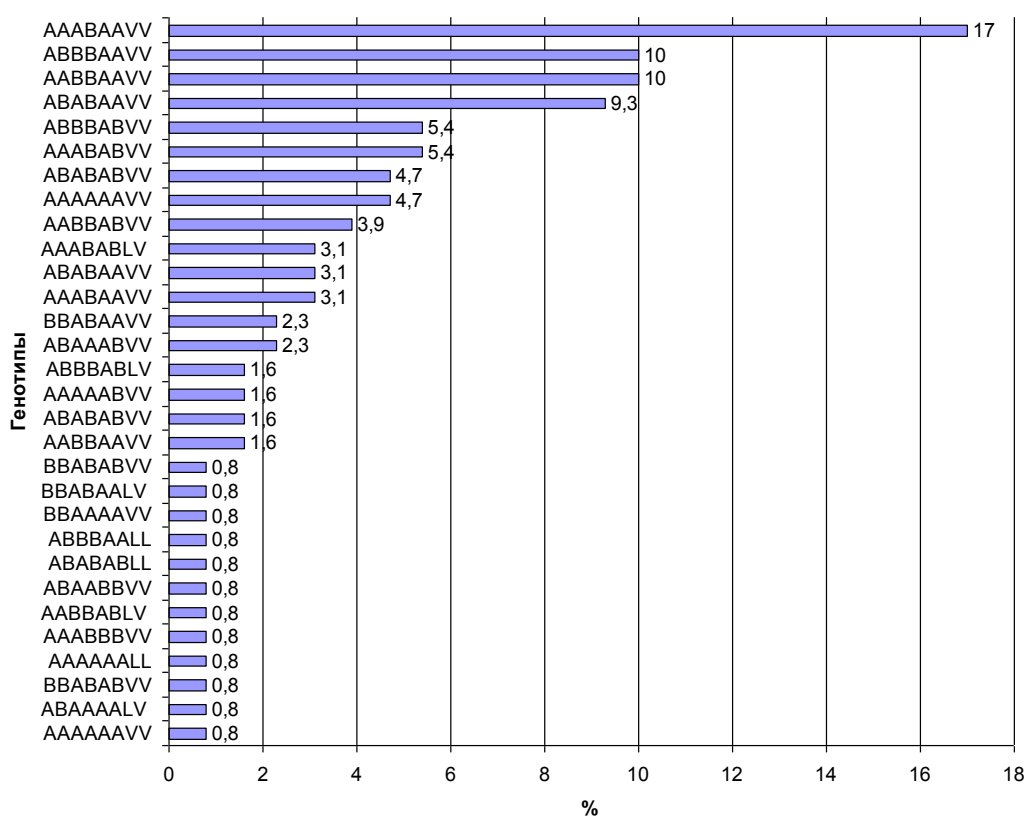


Рисунок 1. Частота встречаемости комплексных генотипов CSN3/BLG/PRL/GH у голштинских коров, %

Выводы. Исследование генотипов главных генов продуктивности у импортного маточного поголовья скота голштинской породы канадской селекции показало, что распределение частот встречаемости аллельных вариантов и генотипов CSN3, BLG, PRL, GH в целом характерно для крупного рогатого скота голштинской породы.

У импортированных коров голштинской породы преобладает аллель А и генотип АА гена каппа-казеина, аллель В и генотипа АВ гена бета-лактоглобулина, аллель V и генотипа VV гена соматотропина, аллель А и генотип АА гена пролактина.

Библиографический список

1. Celic. S. β -Lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk // International dairy journal. 2003, V. 13. NO 9. P. 727-731.
2. Denicourt D., Sabour M.P., McAllister A.J. Detection of bovine k-casein genomic variants by the polymerase chain reaction method // Animal Genetics. 1990. V.21. P. 215-216.
3. Komisarek J., A. Michalak, A. Walendowska The effects of polymorphisms in DGAT1, GH and GHR genes on reproduction and production traits in Jersey cows // Animal Science Papers and Reports. 2011. V. 29, NO. 1. P. 29-36
4. Medrano J.F., Aguilar-Cordova E. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification // Biotechnology. 1990. V. 8. P. 45-48.
5. Mitra A., Schlee P., Balakrishnan C.R., Pirchner F. Polymorphism at growth - hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo // J. Anim. Breed. Genet. 1995. V. 112. P. 71 -74.
6. Pazdera J., Futerová J., Hruban V., Ruottinen O., Erhardt G. Genotyping of κ -casein and β -lactoglobulin of mothers of bulls selected for the Holstein Cattle Breeding Programme in the Czech Republic in the year // Živoč. Vým. 1995. V.40. P. 485-488.
7. Pinder S.J., Perry B.N., Skidmore C.J., Savva D. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction // Journal Animal Genetics. 1991. V. 22. P. 11-20.
8. Sabour M.P., Lin C.Y., Lee A.J., McAllister A.J. Association between milk protein genetic variants and genetic values of Canadian Holstein bulls for milk yield traits // Journal Dairy Sci. 1996 . V.79. NO.6. P. 1050-1056
9. Дунин И.М., Калашникова Л.А., Аджибеков К.К., Ганченкова Т.Б., Хабибрахманова Я.А., Павлова И.Ю, Калашникова Н.Е., Ялуга В.Л., Денисенко Е.А., Рухлова Т.А., Шабанова Л.В. Каталог быков-производителей племпредприятий РФ по гену каппа-казеина// ВНИИПЛЕМ, 2009. С .5-26.
10. Хабибрахманова Я.А., Калашникова Л.А. Генное разнообразие молочных пород крупного рогатого скота // В сб. науч. тр.: «Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы», Белоруссия, Пинск, УО «ПГУ», 2009. С.48-49.
11. Хабибрахманова Я.А., Калашникова Л.А., Алипаных М. Полиморфизм гена пролактина у молочных пород крупного рогатого скота // Научное обеспечение животноводства и кормопроизводства. Саранск . 2008. С. 67-69.
12. Хатами С.Р. ДНК – полиморфизм генов пролактина и гормона роста у ярославской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота // Автореф. дис. канд. биол. наук / Дубровицы. 2004. С. 23 .

УДК 616.151.511

Дятлов Д.А., Пушкарев В.П., Куликов Л.М., Леконцев Е.В., Пушкарева Ю.Э.,
Пушкарев Е.Д.

ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ТРОМБОФИЛИЕЙ, У СПОРТСМЕНОВ РАЗНЫХ ВИДОВ СПОРТА

Ключевые слова: тромбофилия; *F2 G20210A*; *F5 G1691A*; *MTHFR C677T*; спорт.

Введение. Тромбофилия – это нарушение гемостаза, при котором наблюдается склонность к формированию сгустка крови в просвете сосуда вследствие врожденных или приобретенных причин. Тромбофилия является одной из проблем, где был достигнут прогресс в понимании генетических механизмов и имеющей отношение к спортивной деятельности. Доказано, что регулярная физическая активность снижает риск тромбозов у здоровых людей в 1,5 – 2,5 раза. При этом описаны случаи тромбозов у борцов, триатлонистов, марафонцев, футболистов, пловцов, бейсболистов и др. Объяснением этому может быть то, что профессиональное занятие спортом сопряжено с рядом факторов, способствующих развитию тромбозов: длительные перелеты, сгонка веса, гемоконцентрация вследствие дегидратации, полицитемия после тренировок в условиях высокогорья, синдром Педжета—Шрёттера, использование фармакологических стимуляторов (эфедрин, эритропоэтин, анаболические стероиды) [2, 3]. В большом исследовании, включавшем около 6000 человек, MEGA (Multiple Environmental and Genetic Assessment of risk factors for venous thrombosis) было показано, что минорные повреждения ног повышали риск тромбоза в 3 раза. Кроме того, было выявлено 50-кратное повышение риска тромбоза для носителей мутации Лейдена, имевших минорные повреждения ног [4].

Сочетание факторов риска развития тромбоза у представителей разных видов спорта существенно отличается, также как объем аэробных тренировок, которые вызывают адаптивные противотромботические изменения гемостаза [5]. Наше предыдущее исследование показало, что частоты встречаемости протромбиновой мутации (*F2 G20210A*, rs1799963), мутации Лейдена (*F5 G1691A*, rs6025) и вариации *C677T* (rs1801133) гена *MTHFR* у юниоров и спортсменов либо не отличались, либо были несколько выше, чем у людей, не занимающихся спортом [1].

Целью данной работы было оценить частоты встречаемости генетических вариантов, ассоциированных с тромбофилией, среди спортсменов высокого уровня, разделенных по видам спорта на группы, чтобы очертить круг спортсменов, для которых генотипирование маркеров тромбофилии будет максимально полезным.

Материалы и методы.

Было обследовано 820 неродственных жителей Уральского федерального округа, включая 505 спортсменов и 315 человек, не занимавшихся спортом на регулярной основе, не участвующих в соревнованиях, не имеющих спортивного разряда (контроль). Среди спортсменов было 60 перворазрядников, 163 кандидата в мастера спорта, 169 мастеров спорта, 99 мастеров спорта международного класса и 14 заслуженных мастеров спорта. Состав спортсменов по видам спорта представлен в Таблице 1.

Таблица 1. Состав групп спортсменов по видам спорта.

	Игровые виды	Силовые виды	Циклические виды	Единоборства	Сложно-координационные
Виды спорта	Хоккей с шайбой. Хоккей с мячом. Гандбол. Водное поло.	Тяжелая атлетика. Пауэрлифтинг	Конькобежный. Плавание. Бег. Ходьба. Гребля.	Каратэ. Тэквондо. Дзюдо. Вольная борьба. Бокс.	Фигурное катание. Прыжки в воду. Гимнастика. Акробатика.

От всех участников исследования было получено письменное информированное согласие.

Биологические образцы были взяты в виде эпителия ротовой полости с помощью стерильных аппликаторов (Sterile foam tipped applicators, WB10 0032, Whatman, США), либо цельной крови с добавлением цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Геномную ДНК экстрагировали «Набором реагентов для выделения ДНК из различного биологического материала Diatom™ DNA Prep» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия).

Типирование генетических вариаций (детали приведены в таблице 2) проводили с помощью наборов TaqMan® SNP Genotyping Assays на приборе для ПЦР в режиме реального времени StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Результаты экспериментов обрабатывались с помощью TaqMan® Genotyper Software v1.0 (Applied Biosystems). При проведении каждого эксперимента по генотипированию вместе с исследуемыми образцами тестировались положительные контрольные образцы ДНК, в которых гетерозиготность по вариациям rs1799963 в *F2* гене и rs6025 в *F5* гене были подтверждены нами дважды с помощью комплектов реагентов для определения генетических полиморфизмов методом ПЦР в режиме реального времени «КардиоГенетика Тромбофилия» (ООО «ДНК-Технология», Россия) и наборов реагентов для выявления полиморфизмов в геноме человека "SNP-ЭКСПРЕСС" – «Лейденская мутация» и «Мутация протромбина» (ООО НПФ «Литех», Россия). Исследованные образцы ДНК, в которых были выявлены протромбиновая мутация и мутация Лейдена, типировались повторно. В 100% случаев были получены совпадающие результаты.

Табл. 2. Исследованные генетические вариации, связанные с тромбофилией.

Ген (сокращение)	Локализация	Вариация	Метод	Assay ID
Коагуляционный фактор II (<i>F2</i>)	11p11-q12	20210G/A rs1799963	TaqMan® SNP Genotyping Assay	C__8726802_20
Коагуляционный фактор V (<i>F5</i>)	1q23	1691 G/A rs6025	TaqMan® SNP Genotyping Assay	C__11975250_10
Метилентетрагидро-фолат редуктаза (<i>MTHFR</i>)	1p36.3	677 C/T rs1801133	TaqMan® SNP Genotyping Assay	C__1202883_20

Результаты и обсуждение.

Результаты генотипирования представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Частоты встречаемости вариаций последовательности rs1799963 *F2*, rs6025 *F5* и rs1801133 *MTHFR* генов у спортсменов различных видов спорта и в контрольной группе.

	Количество	G/A <i>F2</i> , %	G/A <i>F5</i> , %	T/T <i>MTHFR</i> , %
Контроль	315	2,22 (7) ^а 1,39-3,05 ^б	2,22 (7) 1,39-3,05	9,84 (31) 8,16-11,52
Спортсмены (все)	505	2,77 (14) 2,04-3,50	4,55 (23) 3,63-5,48	9,31 (47) 8,01-10,60
Игровые виды	148	4,05 (6) 2,43-5,68	4,73 (7) 2,98-6,47	14,19 (21) 11,32-17,06
Силовые виды	111	0,90 (1) 0-1,80	1,80 (2) 0,54-3,06	5,41 (6) 3,26-7,55
Циклические виды	119	3,36 (4) 1,71-5,01	5,04 (6) 3,04-7,05	9,24 (11) 6,59-11,90
Единоборства	81	2,47 (2) 0,74-4,19	7,41 (6) 4,5-10,32	8,64 (7) 5,52-11,76
Сложно-координационные	46	2,17 (1) 0,02-4,32	4,35 (2) 1,34-7,35	4,35 (2) 1,34-7,35

Примечание.

^аВ скобках показано количество людей-носителей соответствующего генотипа.

^бВерхняя и нижняя границы 95% доверительного интервала.

Частоты встречаемости протромбиновой мутации в общей группе спортсменов, в группах «циклические виды», «единоборства» и «сложно-координационные виды» не отличались от контроля. В группе «игровые виды» наблюдалась тенденция к росту частоты этой мутации, тогда как в группе «силовые виды» была обратная картина.

Частоты встречаемости мутации Лейдена во всех группах кроме группы «силовые виды» были в 2 и более раза выше, чем в контроле, причем в группе «единоборства» - достоверно ($p = 0,02$).

Частоты встречаемости Т/Т генотипа вариации rs1801133 гена *MTHFR* в общей группе спортсменов, в группах «циклические виды» и «единоборства» не отличались от контроля. В группах «силовые виды» и «сложно-координационные» частота этого генотипа была в 2 раза ниже контрольной, тогда как в группе «игровые виды» наблюдалась тенденция к повышению частоты этого генотипа.

Более высокая по сравнению с контролем частота встречаемости мутации Лейдена среди спортсменов всех исследованных групп, кроме «силовых видов», требует дальнейшего исследования.

В группе «силовые виды», состоящей из высоко квалифицированных тяжелоатлетов и пауэрлифтеров, частоты всех исследованных вариантов, ассоциированных с тромбофилией, были ниже, чем в контроле. Вероятно, к этому приводит особенно неблагоприятное сочетание протромботических факторов в этой группе атлетов (бинтование, сгонка веса, использование фармакологических стимуляторов, небольшой объем аэробных тренировок).

Выводы.

Для спортсменов силовых видов спорта исследование генетических маркеров тромбофилии (вариаций последовательности rs1799963 *F2*, rs6025 *F5* и rs1801133 *MTHFR*) является наиболее целесообразным.

Библиографический список

1. Пушкарев В.П., Дятлов Д.А., Леконцев Е.В. и др. Исследование влияния генетических вариаций, ассоциированных с тромбофилией, на спортивную успешность // Лечебная физкультура и спортивная медицина. 2011. №12. С. 23-28.
2. Adams M., Fell J., Williams A. Exercise causing thrombosis // *Phys Sportsmed*. 2009. V. 37, № 4. P. 124-130.
3. Ozçakar L, Dönmez G, Yörübulut M, et al. Paget-Schroetter syndrome forerunning the diagnoses of thoracic outlet syndrome and thrombophilia // *Clin Appl Thromb Hemost*. - 2010. - Vol.16, №3. - P. 351-355.
4. Van Stralen K.J., Rosendaal F.R., Doggen C.J. Minor injuries as a risk factor for venous thrombosis // *Arch Intern Med*. - 2008. - V. 14, № 168(1). - P. 21-26.
5. Womack C.J., Nagelkirk P.R., Coughlin A.M. Exercise-induced changes in coagulation and fibrinolysis in healthy populations and patients with cardiovascular disease // *Sports Med*. - 2003. - V. 33, № 11. - P. 795-807.

УДК 577.21:796

Жур К.В., Кундас Л.А., Бышнёв Н.И., Морозик П.М., Моссэ И.Б.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г.Минск

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА HIF1A С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ВЫСОКИМ СПОРТИВНЫМ ДОСТИЖЕНИЯМ

***Ключевые слова:* ген HIF-1A; ПЦР-анализ; ДНК-полиморфизмы; спортивный отбор; аэробные и анаэробные нагрузки.**

Введение. Интенсивные физические нагрузки приводят к увеличению потребности тканей в аденозинтрифосфате (АТФ), главном поставщике энергии в клетках всех живых организмов. Продукция АТФ осуществляется двумя основными способами: аэробным (окислительное фосфорилирование), требующим кислорода, и анаэробным, кислород независимым (субстратное фосфорилирование, гликолиз). При выполнении упражнений, мышцы задействуют оба способа для удовлетворения потребностей в энергии, но соотношение между ними определяется типом, интенсивностью и продолжительностью нагрузки. Упражнения на выносливость задействуют преимущественно аэробный тип метаболизма для генерации АТФ, требующие постоянной доставки кислорода к мышцам, в то время как скоростно-силовые виды спорта, состоящие из резких всплесков нагрузки, задействуют в основном анаэробный тип.

При интенсивных физических нагрузках, когда повышенная метаболическая потребность тканей в кислороде не может быть удовлетворена за счет его своевременного транспорта, возникает состояние гипоксии. В ответ на недостаток кислорода, в организме запускаются адаптационные процессы, происходит увеличение продукции транскрипционного фактора Hif1- α , что коррелирует с повышением экспрессии генов усиливающих гликолиз и транспорт глюкозы в клетку, а также генов, стимулирующих ангиогенез и созревание эритроцитов.

Наличие полиморфизмов в последовательности ДНК гена, кодирующего Hif1- α , может влиять на структуру мРНК транскрипционного фактора, функциональное состояние, стабильность и активность синтеза. По данным литературы одним из таких полиморфизмов является однонуклеотидная замена цитозина на тимин, в результате которой происходит замещение аминокислоты пролин в 582 кодоне на серин (Pro582Ser; C1772T; rs11549465). Для носителей генотипа С/Т характерна повышенная экспрессия транскрипционного фактора, а также увеличение соотношения ферментов анаэробного энергообеспечения к ферментам окислительного фосфорилирования в ответ на интенсивные физические нагрузки [1]. Имеющиеся на сегодняшний день данные о роли полиморфных вариантов гена HIF1A в спортивном совершенствовании носят противоречивый характер и не позволяют сделать однозначных выводов об их вкладе в спортивную успешность.

Цель и задачи исследования

Цель работы – оценить вклад полиморфных вариантов С1772Т гена HIF1A в предрасположенность к высоким спортивным достижениям.

Материалы и методы исследования

Проведено генетическое тестирование 179 спортсменов различной специализации (марафон, биатлон, академическая гребля, конькобежный спорт, велоспорт, хоккей, большой теннис, спортивная акробатика) и 163 человек контрольной группы. Испытуемые были предупреждены об условиях эксперимента и дали письменное согласие на добровольное участие в нем.

В качестве биологического материала для исследования использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови с помощью набора реагентов для выделения ДНК (Синтол, Россия). Концентрацию образца измеряли с помощью минифлюориметра Qubit (Invitrogen, США). Генотипирование по полиморфизму С1772Т HIF1A осуществляли методом количественной ПЦР с использованием праймеров и TaqMan-зондов собственного дизайна и набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени (Синтол, Россия). Детекция флюоресценции, а также первичная обработка результатов осуществлялись программным обеспечением прибора CFX96, BIO-RAD (США) в автоматическом режиме.

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

Результаты исследования

При анализе распределения генотипов и частот аллелей полиморфизма С1772Т гена HIF1A в группах спортсменов различных видов спорта установлены более высокие частоты гетерозигот С/Т у хоккеистов, акробатов, гребцов и марафонцев по сравнению с контрольной выборкой (22,6%, 18,2%, 23,3%, 16,7% и 8,6% соответственно). Носителей редкого аллеля 1772Т в гомозиготном состоянии обнаружено не было ни в одной из групп (табл. 1).

Таблица 1 - Распределение частот полиморфных вариантов гена HIF1A в контрольной выборке и группах спортсменов различных видов спорта

Ген	n	Генотипы, %			Аллели, %	
		СС	СТ	ТТ	С	Т
HIF1a C1772T						
Марафон	6	83,3	16,7	0,0	91,7	8,3
Биатлон	18	94,4	5,6	0,0	97,2	2,8
Академическая гребля	30	76,7	23,3	0,0	88,3	11,7
Конькобежный спорт	13	92,3	7,7	0,0	96,2	3,8
Велоспорт	10	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
Хоккей с шайбой	62	77,4	22,6	0,0	88,7	11,3
Большой теннис	29	89,7	10,3	0,0	94,8	5,2
Спортивная	11	81,8	18,2	0,0	90,9	9,1
Контроль	163	91,4	8,6	0,0	95,7	4,3

Для дальнейшего анализа распределения частот генотипов по гену HIF1A спортсменов разделили на две группы по преобладающему типу энергообеспечения. Разделение обусловлено тем, что нагрузки, направленные на формирование скоростно-силовых качеств, отличаются от нагрузок, направленных на формирование выносливости по интенсивности и объему протекающих в организме биохимических процессов [2].

Марафон, биатлон, академическая гребля, конькобежный спорт, велоспорт относятся к циклическим видам спорта, развивающим общую выносливость. Спортсмены этой группы в первую очередь сталкиваются с проблемой гипоксии, так как этот вид спорта характеризуется сравнительно длительной физической нагрузкой на фоне преимущественного повышения аэробного обмена в организме человека [3]. Частота аллеля 1772Т в данной группе спортсменов составила 6,5%, что в 1,5 раза выше, чем в контроле (табл. 2), однако разница статистически недостоверна.

Таблица 2 - Распределение частот полиморфных вариантов гена HIF1A в группах спортсменов циклических видов спорта, требующих выносливости, и в контрольной выборке

Аллели	Спортсмены видов спорта, требующих выносливости	Контроль	χ^2	p	OR	
	n=77	n=163			значение	95%CI
Аллель С, %	93,5	95,7	1,06	0,3	0,65	0,28-1,49
Аллель Т, %	6,5	4,3			1,55	0,67-3,57

Хоккей с шайбой, большой теннис, спортивная акробатика относятся к видам спорта, требующим преимущественного проявления скоростно-силовых качеств, и характеризующимся взрывной, короткой по времени и очень интенсивной физической деятельностью. Энергообеспечение спортсменов в этих видах спорта осуществляется преимущественно за счет анаэробных источников [4]. Частота аллеля 1772Т в данной группе спортсменов оказалась статистически достоверно выше - 9,3% против 4,3% в контрольной группе (табл.3).

Отношение шансов составило 2,3 (доверительный интервал 1,12-4,67). Следовательно, частота встречаемости HIF1A1772Т аллеля у спортсменов, занимающихся скоростно-силовыми видами спорта более чем в 2 раза выше, по сравнению с контрольной выборкой.

Полученные результаты согласуются с теми литературными данными, в которых показана ассоциация 1772Т аллеля гена HIF1A с низким приростом максимального потребления кислорода в результате тренировки [5], а также с

Таблица 3 - Распределение частот полиморфных вариантов гена HIF1A в группах спортсменов скоростно-силовых видов спорта и в контрольной выборке

Аллели	Спортсмены скоростно- силовых видов спорта	Контроль	χ^2	p	OR	
	n=102	n=163			значение	95%CI
Аллель С, %	90,7	95,7	5,41	0,02	0,44	0,21-0,89
Аллель Т, %	9,3	4,3			2,3	1,12-4,67

результатами, показавшими преобладание быстрых мышечных волокон у российских конькобежцев-многоборцев[6].

Выводы. Установлено, что частота встречаемости 1772Т аллеля гена HIF1A у спортсменов, занимающихся скоростно-силовыми видами спорта более чем в 2 раза выше по сравнению с контрольной выборкой. Полученные данные позволяют сделать предположение, что носительство HIF1A 1772Т аллеля ассоциируется с повышенной экспрессией самого транскрипционного фактора, а значит, и с увеличением экспрессии генов гликолиза, в результате чего происходит сдвиг в сторону анаэробного обеспечения мышечной деятельности. Следовательно, 1772Т аллель может быть благоприятным для развития и проявления скоростно-силовых качеств, но в тоже время может негативно сказаться на аэробных возможностях организма. Для окончательного вывода о значении исследуемого полиморфизма для спортивной успешности необходимо проведение дальнейших исследований, включающих как изучение частот полиморфных вариантов гена HIF1A у представителей разных видов спорта, так и оценку степени его экспрессии.

Библиографический список

1. McPhee J.S., Perez-Schindler J., Degens H., Tomlinson D., Hennis P., Baar K., Williams A. G. HIF1A P582S gene association with endurance training responses in young women // Eur J Appl Physiol. 2011. №111(9). С. 2339-2347.
2. Байковский Ю. В. Основы спортивной тренировки в горных видах спорта. М.: ГТК "Цитадель", 2006. 251 с.
3. Бисеров В. В., Рукина И. В., Мухтарова Т. Л., Бородулина М. С., Брехова Л. Л. Физическая культура: учебное пособие. М.: УГТУ-УПИ; Екатеринбург: АСТ, 2008. 275 с.
4. Прилуцкий П.М. Модельные характеристики высококвалифицированных спортсменов. Минск: ГУ «РУМЦ ФВН», 2007. 232 с.

5. Prior S. J., Hagberg J. M., Phares D. A., Brown M. D., Fairfull L., Ferrell R. E., Roth S. M. Sequence variation in hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1A): association with maximal oxygen consumption // *Physiol Genomics*. 2003. №15(1). С. 20-26.
6. Ахметов И.И. Молекулярно-генетические маркеры физических качеств человека // Дис. на соискание уч. ст. д.м.н. Москва, 2010. 344 с.

УДК 575.1

Зятков С.А., Гончаренко Г.Г., Лысенко А.Н.

УО «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», Республика Беларусь, г. Гомель

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ *FELIS CATUS* ВОСТОЧНОЙ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ЗАПАДНОЙ ЕВРОПЫ

Ключевые слова: *Felis catus*, генетическая структура, степень генетической дифференциации, коэффициент генетической дистанции (D_N).

Введение. В настоящее время известен широкий спектр окрасов шерстного покрова у домашних кошек *Felis catus*. Формирование окраса – это сложный процесс, находящийся под контролем ряда генов, при нормальной работе которых у кошек формируется «окрас дикого типа». Все другие цветовые вариации в окрасе меха обусловлены мутациями в соответствующих генах [1]. Частоты встречаемости мутантных и нормальных аллелей генов окраса характерны для каждой популяции и отражают их генетические структуры.

Исследование генетической структуры в популяциях *Felis catus* было инициировано одним из основателей популяционной генетики, Дж. Б. Холдейном. Первая статья на эту тему была опубликована в журнале «The Journal of Heredity» еще в 1949 году Сирлом [2].

Благодаря заслугам популяционных генетиков геогеография *Felis catus* в настоящее время хорошо изучена практически по всему миру. Имеются работы посвященные анализу генетической структуры кошек и в отдельных городах России [3,4]. Однако практически неисследованной остается зона контакта между популяциями СНГ и Западной Европы, с одной стороны, и СНГ и Центральной Азии, с другой.

Целью исследований было установить генетическую структуру и оценить уровень дифференциации популяций *Felis catus* на территории ряда белорусских, российских, украинских, а также центрально- и западноевропейских городов.

Материалы и методы исследования. Материал для популяционно-генетического анализа был собран в 13 городах Беларуси, России и Украины (Минск, Гомель, Могилев, Орша, Речица, Смоленск, Москва, Санкт-Петербург, Новосибирск, Алма-Ата, Ростов-на-Дону, Краснодар, Чернигов). Для сравнительного анализа генетической структуры и степени генетической

дифференциации были использованы также данные по 9 крупным городам различных стран центральной и западной Европы [2].

В каждой популяции домашних кошек были исследованы частоты мутантных аллелей сцепленного с полом локуса Orange – доминантный аллель **O**, а также шести аутосомных локусов (Agouti - рецессивный аллель **a**, Dilute - рецессивный аллель **d**, Long hair - рецессивный аллель **l**, Piebald spotting - доминантный аллель **S**, White - доминантный аллель **W**, Tabby - рецессивный аллель **t^b**). Фенотипическое проявление аллелей, их взаимодействие и методы подсчета аллельных частот подробно описаны ранее [1,4,5]. Для установления сходства и различий между исследуемыми популяциями использовался коэффициент генетической дистанции Неи (D_N) [6].

Для наглядного изображения общей картины генетических взаимоотношений между всеми исследованными популяциями на основании полученных коэффициентов генетической дистанции Неи была построена дендрограмма методом невзвешенного парно-группового кластерного анализа (UPGMA) [7]. Надежность характера ветвления дендрограммы оценивалась при помощи бутстреп-теста Фелзенштейна [8]. Все расчеты проводились с использованием программ «Ген» (версия для PC) и DISPAN [9, 10].

Результаты исследования

Для оценки генетической структуры были рассчитаны частоты встречаемости нормальных и мутантных аллелей окраса и структуры шерсти в каждой из 13 исследованных популяций Беларуси, России и Украины. Аллельные частоты по шести аутосомным и одному сцепленному с полом генам в популяциях *Felis catus* приведены в таблице.

Таблица. Аллельные частоты по семи генам окраса и структуры меха в популяциях *Felis catus* 22 городов восточной, центральной и западной Европы.

Популяции	Частоты аллелей													
	A	A	D	d	L	l	O	o	S	s	W	w	T	t ^b
Минск	0,205	0,795	0,684	0,316	0,467	0,533	0,205	0,795	0,219	0,781	0,010	0,990	1	0
Гомель	0,312	0,688	0,622	0,378	0,529	0,471	0,183	0,817	0,327	0,673	0,015	0,985	0,875	0,125
Могилев	0,255	0,745	0,659	0,341	0,627	0,373	0,181	0,819	0,218	0,782	0,023	0,977	0,861	0,139

Чернигов	Краснодар	Ростов-на-Дону	Алма-Ата	Новосибирск	Санкт-Петербург	Москва	Смоленск	Речица	Орша
0,303	0,480	0,489	0,459	0,381	0,430	0,412	0,225	0,258	0,178
0,697	0,520	0,511	0,541	0,619	0,570	0,588	0,775	0,742	0,822
0,657	0,770	0,646	0,640	0,626	0,580	0,561	0,686	0,624	0,622
0,343	0,230	0,354	0,360	0,374	0,420	0,439	0,314	0,376	0,378
0,452	0,870	0,842	0,438	0,554	0,360	0,481	0,587	0,569	0,423
0,548	0,130	0,158	0,562	0,446	0,640	0,519	0,413	0,431	0,577
0,220	0,070	0,075	0,162	0,203	0,250	0,183	0,267	0,135	0,220
0,780	0,930	0,925	0,838	0,797	0,750	0,817	0,737	0,865	0,780
0,308	0,330	0,323	0,214	0,329	0,310	0,253	0,251	0,386	0,319
0,692	0,670	0,677	0,786	0,671	0,690	0,747	0,749	0,614	0,681
0,043	0,010	0	0,003	0,009	0,010	0	0,016	0,006	0,017
0,957	0,990	1	0,997	0,991	0,990	1	0,984	0,994	0,983
0,880	0,780	0,603	0,845	0,917	0,560	1	0,853	1	1
0,120	0,220	0,397	0,155	0,083	0,440	0	0,147	0	0

Афины	Будапешт	Рим	Амстердам	Варшава	Париж	Глазго	Дублин	Лондон
0,281	0,400	0,340	0,260	0,377	0,290	0,200	0,176	0,238
0,719	0,600	0,660	0,740	0,623	0,710	0,800	0,824	0,762
0,664	0,730	0,660	0,750	0,746	0,670	0,740	0,710	0,858
0,336	0,270	0,340	0,250	0,254	0,330	0,260	0,290	0,142
0,877	0,910	0,900	0,850	0,780	0,760	0,700	0,671	0,670
0,123	0,090	0,100	0,150	0,220	0,240	0,300	0,329	0,330
0,146	0,080	0,090	0,130	0,037	0,060	0,200	0,115	0,105
0,854	0,920	0,910	0,870	0,963	0,940	0,800	0,885	0,895
0,264	0,330	0,310	0,320	0,325	0,240	0,200	0,306	0,313
0,736	0,670	0,690	0,680	0,875	0,760	0,800	0,694	0,687
0,008	0,001	0,010	0,010	0	0,011	0	0,020	0,004
0,992	0,999	0,990	0,990	1	0,989	1	0,980	0,996
0,704	1	0,510	0,430	0,654	0,220	0,200	0,256	0,186
0,296	0	0,490	0,570	0,346	0,780	0,800	0,744	0,814

Примечание. - Данные по Санкт-Петербургу, Краснодару, а также по 9 городам Западной и Центральной Европы взяты из работ [2,3]. Количество проанализированных особей в популяциях в среднем составляло 119.

Исходя из этих данных, следует отметить высокие частоты для мутантных аллелей **a** и **I**, значения которых практически во всех популяциях Беларуси, России и Украины варьировали от 40 до 60%, а в некоторых превышали 70 и даже 80%. Мутантные аллели **S**, **d** и **O** характеризовались средним значением

частот встречаемости, поскольку в большинстве исследованных популяций имели величины от 15 до 40%. Мутантные аллели локусов White и Tabby встречались с низкой частотой.

Сравнительный анализ генетической структуры показал, что практически все исследованные нами популяции России, Беларуси и Украины имеют сходные значения по аллельным частотам 5 локусов (Agouti, Dilute, Long hair, Piebald spotting, White). Только в Краснодаре и Ростове частоты аллеля I оказались значительно ниже, чем в остальных 8 популяциях (табл.).

Интересная ситуация сложилась по мраморному аллелю t^b локуса Tabby. В городах западной и центральной Европы его частота обычно превышает 50%, а в Глазго, Дублине, Лондоне и Париже достигает 80-90% [2]. В исследованных городах России, Беларуси и Украины выявлена в целом низкая частота встречаемости аллеля t^b , а в нескольких популяциях он полностью отсутствовал (табл.). Исключением является популяция Санкт-Петербурга, где частота аллеля t^b составляет 44%. Считается, что аномально высокой частоты в Санкт-Петербурге этот аллель достиг в послевоенный период. За время блокады с 1941 по 1943 годы популяция *Felis catus* в Санкт-Петербурге (Ленинграде) практически полностью исчезла. В апреле 1943 г. после частичного прорыва блокады среди первых грузов, прибывших в Ленинград, были кошки, в основном дымчатого окраса, которые по постановлению Ленсовета были специально завезены в город для борьбы с крысами. По-видимому, среди этих кошек были особи, несущие аллель tb , который сохранился с высокой частотой в современной популяции Санкт-Петербурга. Иными словами столь высокая частота данного аллеля в Санкт-Петербурге обязана действию эффекта основателя. Повышенная по сравнению с другими исследованными популяциями России, Беларуси и Украины частота аллеля t^b в Ростове и Краснодаре (табл.) может быть связана с их близким расположением, как к Черноморским портам, так и к зоне аномального коридора Тегеран-Будапешт, который сформировался под влиянием азиатских кошек [1,3,4].

Не менее сложная ситуация оказалась и по сцепленному с полом гену Orange. В популяциях 13 восточнославянских городов, включая основанную русскими переселенцами Алма-Ату частота мутантного аллеля O колеблется от 14 до 30% (табл.). Результаты проведенных исследований свидетельствуют в пользу того, что эти популяции ведут свое происхождение от кошек, которые появились у нас приблизительно в X-XII вв. в Поднепровье в ходе широких торговых контактов с варягами и греками. В то же время полученные данные по таким южным городам как, Ростов-на-Дону и Краснодар (табл.), а также Баку, Армавир и Орджоникидзе (Украина) [3,4], где частота аллеля O составила только 2-7%, однозначно подтверждают наличие коридора пониженной частоты этого аллеля по линии Иран – Кавказ – Юг Европейской части СНГ – Центральная Европа (Будапешт).

Для более точной количественной оценки генетической дифференциации между 22 исследованными популяциями домашних кошек, включая данные по 9 городам западной и центральной Европы [2] был использован коэффициент генетической дистанции Неи [6], который учитывает различия по всем исследованным локусам, а не только по сильно различающимся. Используя значения коэффициентов генетической дистанции (D_N), посредством невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) нами была построена дендрограмма (рис.), позволяющая проиллюстрировать степень межпопуляционной дифференциации в исследованных популяциях домашних кошек.

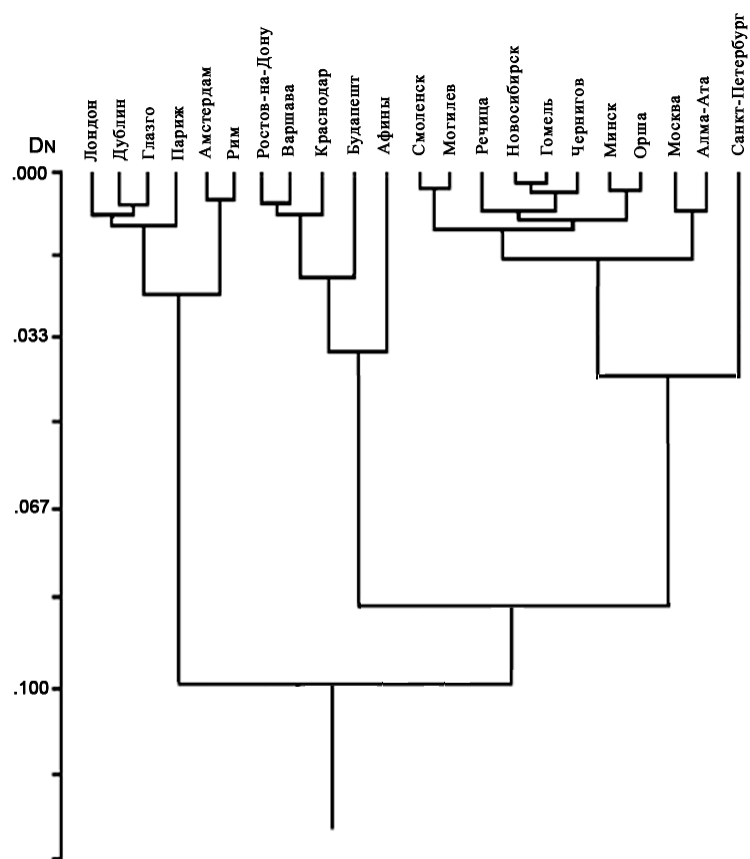


Рисунок. Дендрограмма показывающая степень генетической дифференциации в популяциях *Felis catus* в 22 городах Восточной, Центральной и Западной Европы.

Из дендрограммы хорошо видно, что проанализированные популяции кошек Европейского континента распадаются на три четких кластера. Левый кластер первым ответвляется от общеевропейского ствола и включает в себя только популяции стран западной Европы. На территории этих стран кошки на протяжении пяти веков подвергались массовому уничтожению инквизицией. Все это, по-видимому, обусловило своеобразие и обособленность генетической структуры этих популяций, которая восстанавливалась из редких сохранившихся групп и генотипов под воздействием эффекта основателя и дрейфа генов.

Что касается двух других групп, то некоторый промежуток времени на дендрограмме они составляли единую ветвь, которая затем расщепилась на два кластера белорусско-российско-украинский (восточнославянский) и сложный по составу греко-центрально-европейский (рис.). Популяции домашних кошек *Felis catus*, входящих в состав белорусско-российско-украинского кластера начали формироваться, в Поднепровье в X-XII вв. под влиянием торговых контактов с варягами и греками. Это объясняет тот факт, что центральное ядро правого кластера составляют близко сцепленные популяции городов Смоленск, Орша, Могилев, Речица, Гомель, Чернигов, расположенных в бассейне Днепра. Характер взаимоотношений в правом кластере свидетельствует в пользу того, что дальнейшее расселение кошек на территории России, Беларуси и Украины происходило из Поднепровья, поскольку даже довольно удаленные популяции Москвы, Новосибирска и Алма-Аты на дендрограмме тесно подсоединяются к днепровскому кластеру. Несколько обособленное положение Санкт-Петербурга в восточнославянском кластере вполне закономерно, так как вновь возникшая после войны популяция сформировалась из небольшого числа особей, завезенных в город после частичного прорыва блокады, среди которых могли быть кошки, несущие аллель *tb*. Нельзя исключить и возможность попадания в город кошек с аллелем *tb* с американских и английских судов, побывавших в ленинградском порту.

Закономерным является присутствие двух российских городов в греко-центрально-европейском кластере, так как популяции Краснодара и Ростова расположены в зоне так называемого южного коридора Тегеран – Будапешт.

Выводы. Таким образом в ходе проведенного генетического исследования было установлено, что популяции домашних кошек *Felis catus* восточной, центральной и западной Европы разделяются на три кластера (группы): западноевропейский, греко-центрально-европейский и белорусско-российско-украинский. Показано, что генофонд белорусско-российско-украинских кошек начал формироваться в Поднепровье в X-XII вв. Выявлено действие эффекта основателя на формирование послевоенной популяции кошек Санкт-Петербурга, восстановившейся из небольшого числа особей английского происхождения и подтверждено наличие коридора пониженной частоты аллеля *O* по линии Тегеран – Будапешт.

Исследования проводились в рамках темы ГБЦМ 11-32 «Разработка молекулярно-генетических технологий для диагностики возбудителей описторхоза в окончательных и промежуточных хозяевах» (№ 20111158).

Библиографический список

1. Гончаренко Г.Г. и др. Генетика. Анализ наследственных закономерностей на генах меха кошек *Felis catus*. Гомель: ГГУ, 2007. 108 с.
2. О'Брайен, С. и др. Генетика кошки. Новосибирск: Наука, 1993. 212 с.
3. Borodin P.M. et al. Mutant allele frequencies in domestic cat populations of six soviet cities. *Journal of Heredity*. 1978. V. 69. P.169-174.
4. Гончаренко Г.Г. и др. Мутантные гены окраски в популяциях домашних

кошек Средней Азии и Европейской части СССР. Генетика. 1985, Т. XXI. № 7. С. 1151-1158.

5. Robinson R. Genetics for Cat Breeders. London: Pergamon Press, 1977. 202p.

6. Nei M. Genetic distance between populations. American Naturalist, 1972. V. 106. P. 283-292.

7. Sneath P.H.A. et al. Unweighted pair-group method average, UPGMA. Numerical taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman & Co., 1973. 573 p.

8. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 1985. V. 39. P. 783-791.

9. Гончаренко Г.Г. и др. Учебная программа для обработки эволюционно-генетических данных и их геносистематической интерпретации. Гомель: ГГУ, 1988. 32 с.

10. Ota T. DISPAN: genetic distance and phylogenetic analysis. Institute of Molecular Evolutionary Genetics. The Pennsylvania State University.

УДК 575: 636.2

Ибрагимова Г.Р., Валитов Ф.Р.
ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ

ВЗАИМОСВЯЗЬ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛОКА КОРОВ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ С ПОЛИМОРФИЗМОМ ПО ГЕНУ КАППА - КАЗЕИНА

Ключевые есть: молочная продуктивность, каппа-казеин; генетический контроль.

Известно, что при оценке коров важное значение имеет не только высокая молочность, но и качество молока, то есть содержание в нем жира, белка и других фракций. Казеины составляют 80% от общего содержания белка в молоке. В молоке они присутствуют в форме кальций-фосфатных мицелл (тончайших нитей), в стабилизации которых решающую роль играет каппа-казеин. Каппа-казеин – единственный белок, на который действует сычужный фермент, к тому же каппа-казеин обладает способностью стабилизировать казеиновый комплекс молока.

Доказано, что независимо от породной принадлежности животных объем и качество молочных продуктов в значительной степени определяются наличием В-аллеля гена каппа-казеина. По данным отечественных и зарубежных исследователей, В – аллель каппа-казеина указывает на более высокое содержание белка в молоке, более высокий выход творога и сыра, а также лучшие коагуляционные свойства молока.

Материалом для исследования послужили племенные коровы маточного поголовья черно-пестрой породы (n=120) ООО АП им. Калинина Стерлитамакского района Республики Башкортостан.

Данные о молочной продуктивности получены из племенных карточек 2 МОЛ непосредственно в хозяйстве.

ДНК из крови выделяли по стандартному фенол – хлороформному методу. Оценку полиморфизма гена каппа-казеина проводили на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Качественные показатели молока изучали на приборе LactoStar.

По результатам ПЦР-ПДРФ анализа были сформированы 3 группы коров – с генотипами каппа-казеина CSN3^{AA} (n=48 гол.), CSN3^{AB} (n=65 гол.) и CSN3^{BB} (n=7 гол.).

Термоустойчивость молока определяли при помощи водного раствора этилового спирта с объемной долей этилового спирта 68, 70, 72, 75 и 80% (алкогольная проба).

Результаты анализа молочной продуктивности и качественных показателей молока у коров с разными генотипами по каппа-казеину представлены в таблице 1.

Из таблицы видно, что наиболее высоким удоем отличаются коровы с генотипом CSN3^{BB} – 4858,3±90,4 кг; наименьшим коровы с генотипом CSN3^{AA} – 4507,5±85,9 кг. Разница по удою между генотипами составляет 350,8 кг (p<0,001).

Наиболее жирномолочными оказались также коровы с генотипом CSN3^{BB} – 3,98%, против коров с генотипом CSN3^{AB}, у которых этот показатель был минимальным – 3,95 % (p>0,05).

Наибольшее содержание белка в молоке имеют коровы с генотипом CSN3^{AA} - 3,26%, которые превышают по этому показателю коров с генотипом CSN3^{BB} на 0,04% (p<0,05).

Таблица Молочная продуктивность и качественные показатели молока коров в связи с генотипом каппа-казеина

Показатель	Генотипы		
	CSN3 ^{AA}	CSN3 ^{AB}	CSN3 ^{BB}
Надой, кг	4507,5±85,9	4858,3±90,4	4763,4±50,9
МДЖ,%	3,97±0,029	3,95±0,02	3,98±0,03
МДБ,%	3,22±0,013	3,25±0,007	3,26±0,010
СОМО,%	8,21±0,10	8,17±0,12	8,78±0,08
Плотность, г/см ³	1,029±0,000	1,029±0,000	1,028±0,000
Лактоза	4,99±0,06	4,87±0,10	5,05±0,009
Минеральные вещества	0,75±0,02	0,80±0,04	0,71±0,06
Сычужная свертываемость, мин	34,0±2,08	29,33±0,66	28,33±0,88
Термоустойчивость, мин	73,6+1,02	71,8+0,818	72,6+0,90

По содержанию жира и белка в молоке коровы всех генотипов были однородными: коэффициент изменчивости по жирномолочности составляет от 5,1 до 6,5%; по белкомолочности от 2,7 до 3,0%. По удою отмечается более высокая изменчивость и составляет в пределах от 13,5 до 15,5%.

Одним из важных свойств молока, характеризующее его пригодность для сыроделия, является способность к свертыванию под действием сычужного фермента.

Нами установлено, что время сычужной свертываемости молока коров с генотипом CSN3^{BB} выше, чем у других генотипов.

Наибольшие показатели плотности имело молоко коров с генотипом BB во все периоды лактации. Наименьшее время свертывания имело молоко, полученное от коров с генотипом BB (23 -25 минут). Свертывание молока коров с генотипом CSN3^{AB} и CSN3^{AA} произошло за 33 -41 и 42 - 50 минуты.

Таким образом, результаты исследований показывают, что в исследуемом стаде коров чёрно-пёстрой породы выявлены различия в продуктивности коров с различными генотипами по гену каппа-казеина. Лучшие показатели изученных признаков молочной продуктивности выявлены у коров с генотипами CSN3^{AB} CSN3^{BB}.

УДК 636.1:636.082(575.2)

Ильясов А.Г.

ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, г. Уфа, Россия

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ КАППА-КАЗЕИНА, ПРОЛАКТИНА И СОМАТОТРОПИНА НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ключевые есть: полиморфизм, соматотропин, каппа-казеин, пролактин, ген, ДНК-технологии.

Поиск новых селекционно-генетических подходов к повышению продуктивности животных включает изучение ассоциативных связей конкретных аллелей с различными признаками молочной продуктивности. В настоящее время активно изучаются гены, отвечающие за молочную продуктивность, такие как пролактин (PRL), каппа-казеин (CSN) и гормон роста (GH).

В качестве потенциальных маркеров молочной продуктивности могут рассматриваться аллели генов молочных белков и гормонов. Ген каппа-казеина (CSN3) - связан с белкомолочностью и технологическими свойствами молока. Аллель CSN3^B ассоциирован с более высоким содержанием белка в молоке [1]. Пролактин (PRL) выполняет важные регуляторные функции в процессах дифференцировки эпителиальных клеток молочной железы, лактогенеза и лактации. [4]. Активное участие продуктов гена пролактина PRL в формировании молочной продуктивности (Dybus A., 2002; Alipanah M., 2007) служит основанием для поиска ассоциаций полиморфных вариантов гена с параметрами молочной продуктивности. Соматотропин (гормон роста, GH) - важнейший регулятор, обладающий лактогенным и жиромобилизующим

действием. Рядом исследователей (Dybus A., 2002; Lechniak D., 2002; Pawar R.S., 2007; Михайлова М.Е., 2008) выявлена ассоциация полиморфных вариантов гена GH с показателями продуктивности (удой, содержание жира в молоке).

Следует отметить, что данные исследования носят обособленный характер, нет данных о комплексном использовании их в оценке животных. Это направление и стало целью наших исследований.

Цель наших исследований заключалась в изучении полиморфизма генов каппа-казеина, бета-лактоглобулина, пролактина и соматотропина у крупного рогатого скота и влияния комплексных генотипов на молочную продуктивность.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- определить генотипы животных по локусам генов соматотропина, пролактина и каппа-казеина методом ДНК-диагностики;
- определить генетическую структуру черно-пестрой, симментальской и бестужевской пород по генам соматотропина, пролактина и каппа-казеина;
- установить встречаемость комплексных генотипов по генам молочных белков и гормонов;
- определить влияние комплексных генотипов на молочную продуктивность и качество молока коров.

Методика. Для проведения исследований и оценки генотипов были отобраны племенные коровы черно-пестрой (n=250) и бестужевской породы (n=250) из СПК ПЗ «Ленина» Дюртюлинского района Республики Башкортостан и симментальской породы (n=100) из ОПХ «Баймакское» Баймакского района РБ. У животных были взяты пробы крови и выделены препараты ДНК.

Метод генотипирования с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего анализа полиморфизма длин рестриктных фрагментов (ПДРФ) основан на том, что изменения нуклеотидной последовательности в аллельных вариантах гена приводят к появлению или исчезновению сайтов рестрикции эндонуклеаз. Для проведения ПЦР использовали праймеры (ЗАО «Синтол», Россия):

GH1: 5'-CCGTGTCTATGAGAAGC -3',

GH2: 5'-GTTCTTGAGCAGCGCGT -3',

GH3: 5'-AGAATGAGGCCAGCGAAATC -3';

GH4: 5'-GTCGTCACCTTGCGCATGTTTG -3', (Lucy et al, 1993).

PRL1: 5'-CGAGTCCTTATGAGCTTGATTCTT-3',

PRL2: 5'-GCCTTCCAGAAGTC GTTTGTTTTC-3', (Mitra et al, 1995);

CSN1: 5'-ATAGCCAAATATATCCCAATTCAGT-3',

CSN2: 5'-TTTATTAATAAGTCCATGAATCTTG -3', (D. Denicourt et al, 1990);

При проведении ПЦР (30 – 35 циклов) применяли следующие температуры отжига: CSN3 - 58°C, PRL - 59°C, GH - 60°C. Амплификаты гена CSN3 расщепляли эндонуклеазой HindIII, гена PRL - RsaI, гена GH – AluI, MspI.

(«СибЭнзим-М», Россия). Число и длину фрагментов рестрикции определяли электрофорезом в 3 - 4%-ном акриламидном геле в УФ-свете. В качестве маркера использовали рUC19 DNA/*Msp*I.

При проведении научно-производственных опытов у коров бестужевской, черно – пестрой, и симментальской породы изучали следующие показатели по данным зоотехнического учета (форма 2-мол): удой, содержание жира и белка в молоке, количество молочного жира.

Статистическая обработка данных была выполнена по Меркурьевой Е.К. (1970) и с помощью компьютерной программы «Statistica 6.0».

Результаты и обсуждение. В группе коров бестужевской породы (250 голов) выявлено 26 комплексных генотипов (таблица 1). Из них 4 генотипа имеют частоту более 7 %: $GH^{LV}GH^{CC}PRL^{AA}CSN3^{AA}$ (17,5 %), $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AA}CSN3^{AB}$ (15,2 %), $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AB}CSN3^{AA}$ (13,4 %), $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AB}CSN3^{AB}$ (7,1 %).



Рисунок 1 Частота встречаемости комплексных генотипов у коров бестужевской породы

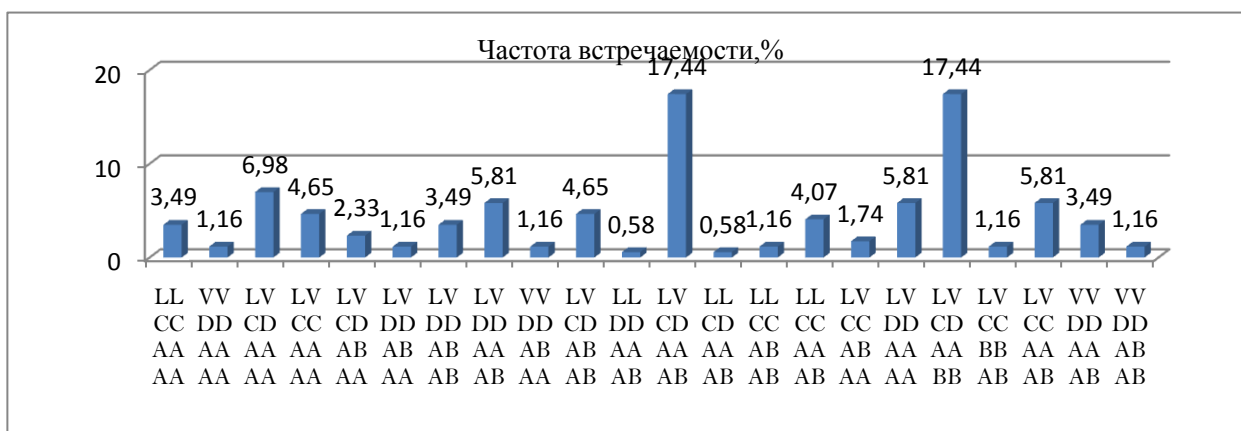


Рисунок 2 Частота встречаемости комплексных генотипов у коров черно-пестрой породы

В группе коров черно-пестрой породы (250 голов) выявлено 22 комплексных генотипа (таблица 2). Из них 6 генотипов имеют частоту более 10%: $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AA}CSN3^{AB}$ (17,4%), $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AA}CSN3^{BB}$ (17,4%), $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AA}CSN3^{AA}$ (5,8%), $GH^{LV}GH^{DD}PRL^{AA}CSN3^{AB}$ (5,8%), $GH^{LV}GH^{DD}PRL^{AA}CSN3^{AA}$ (5,8%), $GH^{LV}GH^{CC}PRL^{AA}CSN3^{AB}$ (4,1%).



Рисунок 3 Частота встречаемости комплексных генотипов у коров симментальской породы

В группе коров симментальской породы (100 голов) выявлен 31 комплексный генотип (таблица 3). Из них только 3 генотипа имеют частоту более 5%: $GH^{LL}GH^{CC}PRL^{AB}CSN3^{AA}$ (12,6%), $GH^{LV}GH^{CC}PRL^{AB}CSN3^{AA}$ (7,2%), $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AB}CSN3^{AA}$ (8,1%).

В группе коров бестужевской и черно-пестрой пород наиболее часто встречаются генотип $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AA}CSN3^A$ с частотой 15,2-17,4%, а между группами бестужевской и симментальской пород генотип $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AB}CSN3^{AA}$ с частотой 8,1-13,4%

Среди трех исследованных пород выявлено 45 комплексных генотипов, из них 9 встречаются у всех 3 пород: $GH^{LL}GH^{CC}PRL^{AA}CSN3^{AA}$, $GH^{LL}GH^{CC}PRL^{AB}CSN3^{AB}$, $GH^{LL}GH^{CD}PRL^{AA}CSN3^{AB}$, $GH^{LV}GH^{CC}PRL^{AA}CSN3^{AA}$, $GH^{LV}GH^{CC}PRL^{AB}CSN3^{AA}$, $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AB}CSN3^{AA}$, $GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AB}CSN3^{AB}$, $GH^{LV}GH^{DD}PRL^{AA}CSN3^{AA}$, $GH^{VV}GH^{DD}PRL^{AB}CSN3^{AA}$.

Среди исследованных коров бестужевской породы наибольшую молочную продуктивность и выход молочного жира имели коровы с генотипами $GH^{LV}GH^{DD}PRL^{BB}CSN3^{AB}$ (4632,5 кг и 171,4 кг), $GH^{LV}GH^{DD}PRL^{AB}CSN3^{AB}$ (4233,2 кг и 160,8 кг), $GH^{VV}GH^{DD}PRL^{AA}CSN3^{AA}$ (4045,1 кг и 155,8кг). Наименьшие надой и выход молочного жира имеют коровы с генотипами $GH^{LL}GH^{CC}PRL^{AB}CSN3^{AA}$ (3008,1 кг) и $GH^{LL}GH^{CC}PRL^{AA}CSN3^{BB}$ (3324,5 кг). По показателю жирности молока имели превосходство коровы со следующими генотипами: $GH^{LV}GH^{CC}PRL^{AB}CSN3^{AA}$ (3,89%), $GH^{LV}GH^{DD}PRL^{AA}CSN3^{AB}$ (3,88%), $GH^{VV}GH^{DD}PRL^{AA}CSN3^{AA}$ (3,86%).

Таблица 1 Продуктивность коров бестужевской породы с комплексными генотипами

№	Генотип	N	%	Удой, кг	Жирность, %	Молочный жир, кг
1	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	8	2,92	3555,2±55,3	3,836±0,05	136,37±27,6
2	GH ^{VV} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	11	4,68	4045,1±119,4**	3,86±0,03*	155,85±59,7*
3	GH ^{LL} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	7	2,34	3613,3±65,3	3,775±0,06	136,40±32,6
4	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	34	17,54	3550,1±28,3	3,795±0,01	134,5±39,5
5	GH ^{LV} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	4	0,58	3672,1±25,1	3,8±0,02	139,53±12,8
6	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	26	13,45	3470,1±110,4	3,814±0,02	132,34±55,21
7	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{BB} CSN ^{AA}	5	1,17	3562,3±492,0	3,8±0,1	135,35±46,05
8	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	7	2,34	3817,3±480,3	3,8±0,04	145,05±40,17
9	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	6	1,75	4233,2±420,7**	3,8±0,057	160,854±10,37*
10	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	6	1,75	3410,6±351,4	3,88±0,05*	132,33±75,72
11	GH ^{VV} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	9	3,51	3887,7±227,3	3,75±0,03	145,78±113,66
12	GH ^{VV} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	6	1,75	3854,1±18,6	3,71±0,04	142,98±9,32
13	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	15	7,02	3323,4±127,8	3,77±0,03	125,29±63,91
14	GH ^{LL} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	4	0,58	3738,0±56,2	3,82±0,012	142,79±14,61
15	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	30	15,2	3643,5±86,5	3,795±0,014	139,88±43,25
16	GH ^{LL} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	9	3,51	3746,0±254,8	3,825±0,018	143,28±27,40
17	GH ^{LL} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	6	1,75	3667,1±38,6	3,67±0,03	141,80±19,31
18	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	11	4,68	3008,1±254,9	3,798±0,04	114,1±23,22
19	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	7	2,34	3655,3±10,4	3,845±0,08	140,54±5,24
20	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	7	2,34	3645,5±30,02	3,8±0,07	138,52±15,04
21	GH ^{LV} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	6	1,75	3545,7±115,3	3,89±0,055**	137,92±57,67
22	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	10	4,09	3651,1±222,4	3,759±0,02	137,24±11,21
23	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{BB} CSN ^{AB}	5	1,17	4632,5±289,7**	3,7±0,023	171,40±48,75*
24	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{BB}	4	0,58	3755,9±64,7	3,84±0,041	144,19±23,4
25	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{BB}	4	0,58	3582,6±46,4	3,7±0,02	132,29±26,1
26	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{BB}	3	0,58	3324,5±279,1	3,75±0,015	124,22±33,4

Разница между группами с разными комплексными генотипами по надою составила 1624 кг молока ($t_d=4,2$ при $p<0,001$), по содержанию жира – 0,22 % ($t_d= 3,5$ при $p<0,001$), по молочному жиру – 56,6 кг ($t_d=2,0$ при $p<0,05$).

Наиболее часто встречающиеся генотипы имеют средние показатели продуктивности.

У коров черно-пестрой породы наибольшую молочную продуктивность и выход молочного жира имели коровы с генотипами GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AA}CSN^{3AA} (4696,3 кг и 176,3 кг), GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AB}CSN^{3AB} (4726,5 кг и 177,3 кг), GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AA}CSN^{3AB} (4633,2 кг и 173,9 кг).

Наименьшие надои и выход молочного жира имеют коровы с генотипами GH^{LL}GH^{CC}PRL^{AB}CSN^{3AB} (3374,1 кг) и GH^{LL}GH^{CC}PRL^{AA}CSN^{3AA} (3448 кг).

По показателю жирности молока имели превосходство коровы со следующими генотипами: GH^{LV}GH^{CC}PRL^{BB}CSN^{3AB} (3,76 %), GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AB}CSN^{3AA} (3,77 %).

Таблица 2 Продуктивность коров черно-пестрой породы с комплексными генотипами

№	Генотип	N	%	Удой, кг	Жирность, %	Молочный жир, кг
1	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	9	3,49	3448±248,6	3,733±0,01	128,71±24,30
2	GH ^{VV} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	5	1,16	4112,5±280,5	3,72±0,05	152,98±40,37
3	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	18	6,98	4696,3±191,7**	3,755±0,05	176,34±45,85
4	GH ^{LV} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	12	4,65	3855,8±105,6	3,737±0,01	144,09±52,80
5	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	8	2,33	4527,5±205,5	3,775±0,01*	170,0±102,75
6	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	6	1,16	4357,5±311,5	3,745±0,01	163,18±55,75
7	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	10	3,49	4298±94,3	3,745±0,08	160,96±47,15
8	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	14	5,81	4394,4±79,9	3,74±0,007	164,35±39,95
9	GH ^{VV} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	6	1,16	4254,0±139	3,755±0,01	159,73±69,50
10	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	11	4,65	4726,5±194,3**	3,752±0,01	177,33±47,15
11	GH ^{LL} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	5	0,58	3787±56,4	3,77±0,01	142,76±36,55
12	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	36	17,44	4633,2±173,1**	3,754±0,04	173,93±73,0
13	GH ^{LL} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	5	0,58	3505±33,7	3,74±0,015	131,08±12,8
14	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	6	1,16	3374±246	3,745±0,005	126,35±73,00
15	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	10	4,07	3523±98,4	3,74±0,01	131,76±49,20
16	GH ^{LV} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	6	1,74	3384,6±243,5	3,757±0,01	127,15±21,75
17	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	13	5,81	4373,2±55,3	3,739±0,01	163,51±27,65
18	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{BB}	35	17,44	4633,2±73,2	3,754±0,004	173,93±36,60
19	GH ^{LV} GH ^{CC} PRL ^{BB} CSN ^{AB}	6	1,16	3895±91,0	3,765±0,005	146,64±45,50
20	GH ^{LV} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	14	5,81	3583,8±167,8	3,731±0,01	133,71±83,9
21	GH ^{VV} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	9	3,49	3740,8±146,7	3,72±0,018	139,12±73,35
22	GH ^{VV} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	6	1,16	4595,5±244,5	3,74±0,01	171,87±12,25

Разница между группами с разными комплексными генотипами по надою составила 1352,5 кг молока ($t_d=4,1$ при $p<0,001$), по содержанию жира – 0,06 % ($t_d= 1,1$ при $p<0,05$), по молочному жиру – 51 кг ($t_d=0,58$ при $p<0,05$).

Среди коров симментальской породы наибольшую молочную продуктивность и выход молочного жира имели коровы с генотипами GH^{VV}GH^{CC}PRL^{AB}CSN^{AA} (4699 кг и 176,7 кг), GH^{VV}GH^{DD}PRL^{AB}CSN^{AA} (4459,6 кг и 170,8 кг), GH^{VV}GH^{DD}PRL^{BB}CSN^{AA} (4089 кг и 150,5 кг).

Наименьшие надои и выход молочного жира имеют коровы с генотипами GH^{LL}GH^{CC}PRL^{AB}CSN^{BB} (1805 кг) и GH^{LL}GH^{CC}PRL^{AA}CSN^{BB} (1840 кг).

По показателю жирности молока имели превосходство коровы со следующими генотипами: GH^{LV}GH^{CD}PRL^{AB}CSN^{AB} (4,15%), GH^{VV}GH^{CD}PRL^{AB}CSN^{AB} (4,14 %).

По содержанию белка в молоке превосходили коровы с генотипами GH^{LL}GH^{DD}PRL^{AB}CSN^{AA} (2,93 %), GH^{VV}GH^{CD}PRL^{AA}CSN^{AA} (2,9 %), а самое низкое наблюдалось у животных с генотипами GH^{LL}GH^{CC}PRL^{AB}CSN^{AA} (2,7 %), GH^{LL}GH^{CC}PRL^{BB}CSN^{AA} (2,78 %).

Таблица 3 Продуктивность коров симментальской породы с комплексными генотипами

№	Генотип	N	%	Удой, кг	Жирность, %	Молочный жир	Белок, %
1	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	4	3,6	2184,7±205,5	3,97±0,1	86,7±12,7	2,84±0,2
2	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{BB}	2	1,8	2589±114,1	3,83±0,2	99,2±12,8	2,9±0,01
3	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	13	12,6	2521,9±127,8	4,13±0,15	104,2±10,6	2,7±0,3
4	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	2	0,9	2880±88,3	3,67±0,12	105,7±18,1	2,84±0,12
5	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{BB}	3	2,7	1805±184,1	4,11±0,4	74,2±10,1	2,87±0,12
6	GH ^{LL} GH ^{CC} PRL ^{BB} CSN ^{AA}	3	2,7	2696±25,3	4,17±0,2	112,4±10,8	2,78±0,01
7	GH ^{LL} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	3	2,7	2743,3±113,8	3,87±0,016	106,2±2,4	2,77±0,15
8	GH ^{LL} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AB}	2	1,8	2483,5±156,1	4,09±0,012	101,6±3,1	2,85±0,14
9	GH ^{LL} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{BB}	2	0,9	1840±165,2	3,79±0,14	69,7±45,9	2,78±0,11
10	GH ^{LL} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	4	4,5	2813,1±111,7	4,01±0,2	112,8±12,9	2,88±0,2
11	GH ^{LL} GH ^{CD} PRL ^{BB} CSN ^{AA}	2	0,9	2857±78,6	4,2±0,12	120,0±23,1	2,78±0,3
12	GH ^{LL} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	2	1,8	1906±74,3	3,93±0,05	74,9±17,5	2,84±0,16
13	GH ^{LL} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	3	2,7	2612,6±117,5	3,94±0,03	102,9±2,1	2,93±0,12
14	GH ^{LL} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	2	0,9	2928±32,5	3,86±0,02	113,0±15,9	2,81±0,01
15	GH ^{LV} GH ^{CC} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	2	0,9	3472±26,3	4,05±0,12	140,6±14,3	2,89±0,15
16	GH ^{LV} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	8	7,2	2989,7±76,3	4,07±0,02	121,7±12,3	2,81±0,11
17	GH ^{LV} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	2	0,9	3190±19,8	4,08±0,11	130,2±17,3	2,8±0,16
18	GH ^{LV} GH ^{CC} PRL ^{BB} CSN ^{AA}	3	2,7	3184,3±125,9	3,99±0,01	127,1±32,4	2,88±0,1
19	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	2	0,9	3601±27,3	3,75±0,15	135,0±11,6	2,81±0,12
20	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	9	8,1	3429,7±45,3	3,99±0,16	136,8±37,1	2,87±0,15
21	GH ^{LV} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	2	1,8	2782±89,6	4,15±0,11	115,5±22,7	2,79±0,2
22	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	2	1,8	2829±78,1	3,93±0,13	111,2±2,3	2,77±0,17
23	GH ^{LV} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{BB}	2	0,9	2699±45,6	3,99±0,15	107,7±23,4	2,93±0,12
24	GH ^{VV} GH ^{CC} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	2	1,8	4699±145,3**	3,76±0,25	176,7±91,9*	2,81±0,2
25	GH ^{VV} GH ^{CD} PRL ^{AA} CSN ^{AA}	2	1,8	4000,5±156,2	3,96±0,14	158,4±70,2	2,9±0,1
26	GH ^{VV} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	4	3,6	4075±158,2	4,09±0,2	166,7±74,3*	2,81±0,15
27	GH ^{VV} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{AB}	2	0,9	1675±112,1	4,14±0,11	69,3±47,2	2,81±0,18
28	GH ^{VV} GH ^{CD} PRL ^{AB} CSN ^{BB}	2	0,9	3860±113,7	3,97±0,01	153,2±26,2	2,76±0,1
29	GH ^{VV} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{AA}	5	4,5	4459,6±126,3**	3,83±0,01	170,8±15,8*	2,81±0,16
30	GH ^{VV} GH ^{DD} PRL ^{AB} CSN ^{BB}	2	0,9	3942±57,5	3,5±0,15	138,0±20,4	2,88±0,12
31	GH ^{VV} GH ^{DD} PRL ^{BB} CSN ^{AA}	2	0,9	4089,0±126,2**	3,68±0,02	150,5±14,3	2,84±0,1

Разница между группами у коров симментальской породы с разными комплексными генотипами по надою составила 2984 кг молока ($t_d=12,9$ при $p<0,001$), по содержанию жира – 0,67 % ($t_d= 2,17$ при $p<0,05$), по молочному жиру – 107 кг ($t_d=2,1$ при $p<0,05$).

Библиографический список

1. Калашникова, Л.А. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных. [Текст] / Л.А.Калашникова, И.М.Дунин, В.И. Глазко. – Московская область, Лесные Поляны: Изд-во ВНИИплем, 1999.

2. Калашникова, Л.А. Влияние полиморфизма генов молочных белков и гормонов на молочную продуктивность коров черно-пестрой породы. [Текст] / Л.А.Калашникова, Я.А. Хабибрахманова /Доклады РАСХН, 2009, - №3. – С. 49-51.

3. Удина, И.Г., Туркова С.О. и др. Полиморфизм гена пролактина (микросателлиты, ПЦР-ПДРФ) у крупного рогатого скота. [Текст] / И.Г.Удина, С.О. Туркова // Генетика, 2001.- №4. – Т.37. – С.511-516.

УДК 638.1

Ильясов Р.А., Макаров В.Л., Поскряков А.В., Николенко А.Г.

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СРЕДНЕУРАЛЬСКОЙ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

Ключевые есть: Среднерусская пчела, ДНК-маркирование, митохондриальная ДНК, морфометрия, популяция

Среднерусская пчела занимает широкий ареал обитания. В настоящее время по всему ареалу среднерусских пчёл преобладают гибриды разных рас пчёл. Пермский край является северной границей естественного обитания всего вида *Apis mellifera* L. Ранее установлено (Петухов, 1996; Ильясов и др., 2006), что аборигенная популяция медоносной пчелы неоднородна – есть пасеки как с чистопородными, так и с гибридными пчелиными семьями.

Целью настоящего исследования являлось продолжение изучения структуры популяции медоносной пчелы Пермского края. Для этого определяли:

1. морфометрические признаки рабочих пчёл по общепринятой методике (Билаш, Кривцов, 1991);

2. кубитальный индекс крыла рабочих пчёл в программе *Coorecorder*;

3. полиморфизм локуса COI-COII митохондриальной ДНК, что является генетическим маркером расовой принадлежности пчел (Николенко и др., 2002).

Для исследования расовой принадлежности, а также для определения и оценки степени гибридизации, были исследованы десять пасек из разных районов Пермского края (Табл. 1).

Препарированные хитиновые части тела пчёл приклеивали с помощью канцелярского клеящего карандаша на бумагу и ламинировали. Часть измерений производили с помощью окуляр-микрометра на бинокляре МБС-9. Крылья сканировали и в программе *Coorecorder* по кубитальному индексу определяли расовую принадлежность исследуемых пчёл. Стандартными значениями кубитального индекса среднерусских пчёл считается 60-65%, или меньше 1,7 по европейским стандартам. Для пчёл южных рас характерен индекс меньше 60%, или больше или равно 1,7.

Таблица 1 Исследованные пасеки Пермского края

№ п/п	Хозяйство, населённый пункт	Район	Количество п/с на пасеке	Количество исследованных пчел
1	ООО «Парасоль»	Пермский	300	300
2	«Покровское»	Осинский	120	300
3	«В.-Кважва»	Добрянский	30	300
4	д. Берёзовка	Березниковский	20	100
5	п. Юго-Камск	Юго-Камский	20	100
6	с. Фролы	Пермский	10	100
7	д. Тёмная	Чернушенский	40	100
8	п. Южный	Пермь	10	100
9	п. Ильинский	Ильинский	30	100
10	г. Чайковский	Чайковский	50	100

Полученные значения морфометрических признаков по разведенческим пасекам приведены в таблице 2. В результате установлено, что исследованные пчёлы по всем признакам, кроме кубитального индекса, соответствуют среднерусским пчёлам *A.m.mellifera*.

Таблица 2 Морфометрические признаки рабочих пчёл разведенческих пасек Пермского края (n=300)

пасека \ признак	«В.-Кважва»	«Покровское»	«Парасоль»
	Длина хоботка $M \pm m$ Lim C v %	6,07±0,007 5,7-6,5 2,2	6,15±0,005 5,6-6,4 2,0
Длина крыла $M \pm m$ Lim C v %	9,31±0,019 9,0-10,6 2,0	9,47±0,008 9,2-10,3 1,8	9,25±0,008 8,9-9,8 1,9
Ширина крыла $M \pm m$ Lim C v %	3,13±0,006 2,9-3,5 3,5	3,10±0,004 2,7-3,4 2,7	3,14±0,004 3,0-3,3 2,7
Длина 4-го тергита $M \pm m$ Lim C v %	2,40±0,006 1,9-2,9 4,9	2,31±0,004 2,0-2,6 3,9	2,42±0,005 1,9-2,9 4,3
Ширина 4-го тергита $M \pm m$ Lim C v %	4,82±0,009 4,6-5,3 3,2	5,06±0,006 4,7-5,6 2,7	4,88±0,005 4,5-5,3 2,5
Кубитальный индекс $M \pm m$ Lim C v %	55,6±0,42 33-72 12,9	56,2±0,30 40-82 11,0	54,4±0,34 36-71 11,7

Значения кубитального индекса полученные в программе CooRecorder занесены в сводную таблицу 3, при этом пасеки распределены в две группы – чистопородных (куб. инд.< 1,7) и гибридных (куб. инд.≥ 1,7).

Результаты морфометрического анализа и частоты вариантов полиморфного локуса COI - COII мтДНК совместно с породными стандартами для среднерусской и серой горной кавказской пчёл приведены в таблице 4.

Таблица 3 Средние значения кубитального индекса пчёл исследованных пасек

№ п/п	Хозяйство, населённый пункт	Кубитальный индекс
чистопородные		
1	ООО «Парасоль»	1,5
2	хоз-во «Покровское»	1,6
3	«В.-Кважва»	1,6
4	д. Берёзовка	1,5
5	п. Юго-Камск	1,5
6	п. Южный	1,6
гибридные		
1	д. Тёмная	1,7
2	п. Ильинский	1,8
3	г. Чайковский	1,7
4	с. Фролы	1,9

Таблица 4 Морфометрические показатели и частота встречаемости вариантов полиморфного локуса COI - COII мтДНК *Apis mellifera*

№ п/п	Пасека	Длина хоботка М (мм)	Кубит. индекс М (%)	Шир. тергита М (мм)	Частота PQQ, PQQQ
1	ООО «Парасоль»	6,06	54,4	4,89	0,90
2	п. Юго-Камский	-	56,1	-	1,00
3	хоз-во «Покровское»	6,07	56,2	4,88	1,00
4	д. Березовка	-	54,9	-	1,00
5	«В.-Кважва»	6,06	55,6	4,82	1,00
Стандарт среднерусских пчел		6,00- 6,40	60,0- 65,0	4,80- 5,20	
Стандарт серых горных кавказских пчел		6,70- 7,20	50,0- 55,0	4,40- 5,00	

Для среднерусской пчелы *A.m.mellifera* характерны варианты PQ, PQQ, PQQQ межгенного локуса COI-COII мтДНК по материнской линии. Пчелы, собранные с пасек Пермского края, характеризовались довольно высоким уровнем частоты встречаемости комбинаций PQQ мтДНК. По подсчетам частот встречаемости аллелей у всех исследованных пчёл доля варианта PQQ выше 0,9, что является показателем их принадлежности по происхождению к среднерусским пчелам в 90 % случаях.

Выводы

1. Результаты морфометрического анализа показали, что исследованные пчёлы соответствуют стандарту среднерусской расы. Особенностью является низкий кубитальный индекс.

2. Результаты молекулярно-генетического анализа по локусу COI-COII мтДНК свидетельствуют об отсутствии значительной генетической дифференциации пчёл Пермского края и единстве происхождения популяции по материнской линии от пчел среднерусской расы, аборигенной для Северной Евразии.

Библиографический список

1. Билаш Г.Д., Кривцов Н.Н. Селекция пчел / Г.Д. Билаш, Н.Н. Кривцов. – М.: Агропромиздат. 1991. – 302 с.

2. Ильясов Р.А., Петухов А.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г. На Урале сохранились резерваты *Apis mellifera mellifera* L. // Пчеловодство. 2006. – №2. – С. 19.

3. Николенко А.Г., Поскряков А.В. Полиморфизм локуса COI-COII митохондриальной ДНК *Apis mellifera* L. на Южном Урале // Генетика. 2002. - №4. - С. 458-462.

4. Петухов А.В. и др. Морфологическая характеристика среднерусских пчел верхнекамской популяции // Пчеловодство. 1996. – №5. – С. 8-10.

УДК 636.2.082:577.27

Ильясова Э.И., Петрова И. Г.

ЗАВИСИМОСТЬ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КОРОВ ОТ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКОГО СХОДСТВА РОДИТЕЛЕЙ

Ключевые есть: антигенные факторы, продуктивность, генетическое сходство, маркер-зависимая селекция

Генетическая обусловленность продуктивных признаков сельскохозяйственных животных зависит от комбинации генов родителей, что можно выявить только с помощью специальных исследований.

Уже давно установлены широкие возможности использования в селекции данных о группах крови животных. Четкий характер наследования и неизменяемость в онтогенезе делает их удобными и надежными маркерами динамики генетических структур в поколениях потомков, показателем организации генетического материала в популяциях и у отдельных особей, уровня гомо- и гетерозиготности и пр.

Последнее в контексте рассматриваемой проблемы является особенно важным, поскольку с помощью антигенных факторов или аллелей групп крови

можно судить о степени генетического сходства животных и уровне их индивидуальной гетерозиготности [1,2].

Гены, контролирующие группы крови, представляют собой часть общего генофонда. Однако преимущество их на сегодняшний день состоит в том, что они могут быть выявлены и подсчитаны. Созданная в процессе эволюции система интеграции генетического материала позволяет с их помощью судить о характере и структуре других, сцепленных с ними комплексов генов, определяющих в числе прочего и различные хозяйственно-полезные признаки животных.

На основе иммуногенетических данных можно вести маркерзависимую селекцию скота, позволяющую в наибольшей степени реализовать потенциальные возможности животных по продуктивным признакам. Обоснованным и универсальным методом использования иммуногенетических параметров в практике является учет степени иммуногенетического сходства (различий) между родителями в связи с продуктивными качествами дочерей.

Цель исследований состояла в том, чтобы сравнить молочную продуктивность коров дочерей в зависимости от иммуногенетического сходства родителей.

Материалом для исследования послужили коровы чёрно-пёстрой породы первой лактации ГУСП совхоза «Алексеевский». Групповые эритроцитарные антигены определяли гемолитическими тестами по общепринятым методикам с использованием 50 моноспецифических сывороток (реагентов). Частота антигенов групп крови определялась методом прямого подсчёта. Коэффициент антигенного сходства родителей рассчитывался по формуле [3]:

$$C_{as} = \frac{(A_{bi} + A_{ci})}{(A_b + A_c)},$$

где A_{bi} и A_{ci} - число идентичных генов у спариваемых животных;
 A_b и A_c - общее число антигенов у спариваемых животных.

Были выделены две группы родителей. В первой группе коэффициент антигенного сходства составлял менее 0,2 ($n=10$); во второй – больше 0,2 ($n=10$).

Надой коров-дочерей из первой группы по первой лактации составил $8622 \pm 176,1$ кг; из второй - $7625,2 \pm 207,1$ кг. Эта разница в 996,8 кг является достоверной ($t_d=3,7$; $p<0,001$).

Таким образом, при уменьшении иммуногенетического сходства родителей продуктивность дочерей возрастает, и, наоборот, с его повышением – снижается. Следовательно, при подборе родительских пар рекомендуется учитывать генетическое сходство родителей по антигенным эритроцитарным факторам.

Приведенные данные свидетельствуют о возможности применения результатов иммуногенетического мониторинга для повышения эффективности селекции в процессе создания высокопродуктивных стад коров.

Поиск удачных сочетаний пар должен идти с учетом групп крови, которые могут маркировать показатели продуктивности.

Библиографический список

1. Долматова И.Ю. Генетическая экспертиза племенной продукции. // Сельские узоры.-2006, №1.- С. 16-17.
2. Максимова Л., Петрачкова И., Шульга Л. Использование иммуногенетических маркеров при выведении внутривидового типа айрширского скота //Молочное и мясное скотоводство, 2007, №5. - С.9-12.
3. Охапкин, С.К. и др. Методические рекомендации по использованию групп крови для индивидуального подбора крупного рогатого скота/.М.: ВНИИплем, 1996.-37с.

УДК 638.145

Калашников А.Е.¹, Масленников И.В.², Колбина Л.М.², Удина И.Г.¹

¹ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ²ГНУ Удмуртский НИИСХ РАСХН

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFERA* L. РЕСПУБЛИКИ УДМУРТИЯ

Ключевые есть: митохондриальная ДНК; кубитальный индекс; порода; чистопородность; пчелы; *Apis mellifera* L.; вирусы пчел; вирус деформации крыла; вирус мешотчатого расплода; вирус острого паралича; вирус хронического паралича; ассоциации вирусов пчел; варооз; *Varroa destructor*.

Введение. Пчела медоносная *Apis mellifera* является известной и морфологически и этологически [1]. Пчелы среднерусской породы *A. m. mellifera* L. Широко распространены на территории России, в том числе в республике Удмуртия [2, 3] и Башкортостан [4]. Эти пчелы зимостойки, устойчивы к ряду заболеваний, способны эффективно использовать короткий медосбор. Их хоботок короткий - 6,0–6,4 мм, они темной окраски, отличаются светлой «сухой» печаткой меда, но агрессивны и склонны к повышенному роению. Значение кубитального индекса (КИ) стандарта породы находится в пределах 0,60-0,65 [5].

В России, как и в Европе и Северной Америке, под воздействием антропогенного фактора произошла гибридизация *A. m. mellifera* подвидами медоносной пчелы, распространенными в более южных широтах. Если в Европе произошла гибридизация подвида *A. m. mellifera* в основном с подвидами *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* [6], то в России с подвидами *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. caucasica* [2, 3, 4]. Интрогрессия южных пород не только ухудшает промышленные качества местных северных пород и приспособляемость пчел к природным условиям, но и снижает иммунитет, повышается восприимчивость пчел к заражению эктопаразитами, увеличивается распространенность ряда заболеваний, в том числе вирусного происхождения [7].

Заражение пчел клещом *V. destructor* также является предрасполагающим фактором для инфицирования пчел вирусами [8, 9, 10]. С одной стороны, клещ является резервуаром для векторов вируса, с другой стороны, инвазия клеща ослабляет иммунитет пчел и способствует развитию вирусной инфекции [8, 9]. Из обнаруженных вирусов медоносной пчелы шесть вирусов вызывают тяжелые последствия при инфицировании – гибель пчелиных семей. Это вирусы: деформации крыла (DWV), вирус острого паралича (ABPV), вирус хронического паралича (CBPV), кашмирский вирус (KBV), вирус мешотчатого расплода (SBV), вирус черных маточников (BQCV) [8].

Целью данной работы являлось описание генетического разнообразия пчел популяций республики Удмуртия при помощи морфометрического анализа (по данным анализа кубитального индекса) (КИ), описание генетического разнообразия пчел при помощи анализа митохондриального генома пчелы (мтДНК) для дальнейшей паспортизации основных пород пчел, а также оценка распространенности РНК-содержащих вирусов пчел.

Материалы и методы

В работе использовались рабочие пчелы среднерусской породы с территории Удмуртской республики. При морфометрическом анализе и анализе мтДНК: д. Красный Яр (1UD_S) (N=11), д. Б. Уча (2UD_S) (N=24), д. Моторки (3UD_S) (N=23), г. Ижевск 9 км (4UD_S) (N=8), Воткинский район (5UD_S) (N=7) а при анализе на наличие вирусной РНК N=90 (30 семей, образцы которых объединены в пулы по 3 пчелы в каждом).

Рассмотрение породной принадлежности при помощи морфометрического анализа (КИ) проводили по методике, рекомендованной ГНУ НИИ пчеловодства РАСХН. Значение КИ рассчитывали в долях от единицы (по литературным данным иногда указывается обратная величина 1/КИ, либо КИ в %). [5]. Геномная ДНК выделялась при помощи набора “Diatom DNA prep 400” (Изоген, Россия). Выделение РНК проводили с применением набора “Trizol” (Изоген, Россия). ПЦР мтДНК проводили при помощи набора “ScreenMix” (Евроген, Россия). Так как генетический материал вируса представлен РНК, то на первом этапе ОТ-ПЦР образуется кДНК с помощью фермента обратной транскриптазы. Полученная кДНК служит матрицей на последующих этапах ОТ-ПЦР. Таким образом, определение присутствия вирусной инфекции проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) при помощи набора “GenPack RT-PCR Core” и “ScreenMix” (Изоген, Россия). В реакции ПЦР мтДНК использовали праймеры F-5'-tggcagaataagtgcattgaa-3' и R-5'-cagcataatgaatttgattcttga-3' [10]. В реакции ОТ-ПЦР применялись праймеры ABPV F-5'gtgctatcttggaaactac-3', R-5'-aaggtttaggttctactact-3'; для BQCV F-5'-agtagttgcatgtacttcc-3', R-5'-cttagtcttactcgccactt-3'; для CBPV F-5'-tgtcgaactgaggatcttac3', R-5'-gacctgattaacgacgtag-3'; для DWV F-5'-attgtgccagattggactac-3', R-5'-agatgcaatggaggatacag-3'; для KBV F-5'-gatgaacgtcgacctattga-3', R-5'-tgtgggttgctatgagtca-3'; для SBV F-5'-accaaccgattcctcagtag-3', R-5'-ccttggaaactctgctgtga-3' [8].

Определение типа породы (среднерусская против южной породы) проводилось при помощи ПЦР анализа области СО-I/СО-II цитохромоксидазы мтДНК пчел [2, 3, 4, 10]. Эта область мтДНК содержит элемент Р длиной 54 п.н., затем некоторое количество элементов Q, которыми отличаются пчелы южных популяций от северных, и фланкируется 3'- областью гена СО-I и 5'- областью гена СО-II длиной (обе области) 50 п.н. Известно, что в этой области у пчел южных пород содержится один элемент Q (длина 196 п.н.), а у пчел северных популяций два и более элемента Q. Однако признак гаплотипа неоднозначен, индивид может иметь более чем один митотип (гетероплазмия).

Математическую и статистическую обработку результатов проводили при помощи программы "Excel" (Microsoft, США). Обработку фотографий проводили в программе Corel X13 (Corel, США).

Результаты и обсуждение

Отклонения средних значений КИ для южных пород в большую сторону от стандарта [5] предварительно свидетельствуют о метизации с среднерусской породой, а в случае отклонения КИ для среднерусской породы в меньшую сторону, – о метизации последней с южными породами [2, 3, 4, 10]. Однако необходимо учитывать, что среднее значение КИ является средневзвешенной величиной, и не отражает в полной мере факт наличия или отсутствия метизации пород, а лишь в целом характеризует соответствие выборки породы породному стандарту по морфометрическим показателям. Средние значения КИ пчел Удмуртской популяции 14UD_S, 15UD_S, 16UD_S, 17UD_S и 18UD_S также были меньше стандарта породы на 17, 7, 7, 8 и 10% соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Морфометрические показатели и частоты митотипов пчел

№ п/п	№ выборки	N	КИ	Доверительный интервал (P=0,05)	CV	КИ _{мин}	КИ _{макс}	Варианты митотипов		
								350 PQ	546 PQQ	546/796 PQQ/P3xQ
14	1UD_S	11	0,499	±0,037	0,125	0,409	0,600	0,1538	0,8462	
15	2UD_S	24	0,557	±0,040	0,178	0,318	0,750		0,9600	0,0400
16	3UD_S	23	0,557	±0,030	0,132	0,429	0,722		1,0000	
17	4UD_S	8	0,550	±0,034	0,089	0,500	0,632		1,0000	
18	5UD_S	7	0,537	±0,053	0,134	0,450	0,625	0,6000	0,4000	

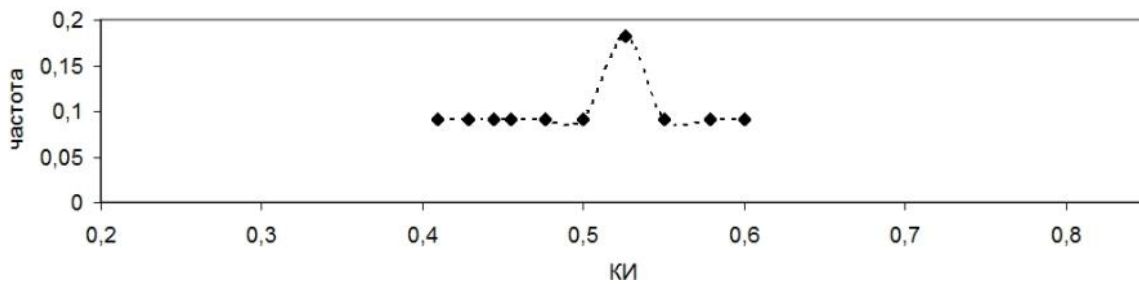
Дополнительно нами при помощи ПЦР проанализирован участок мтДНК СО-I/СО-II (табл. 1).

Рассмотрим каждую выборку пчел одновременно как с позиции морфометрического (КИ), так и анализа мтДНК, – это позволяет детально выявить степень чистоты породы и выявить уровень метизации пчел в семьях популяции.

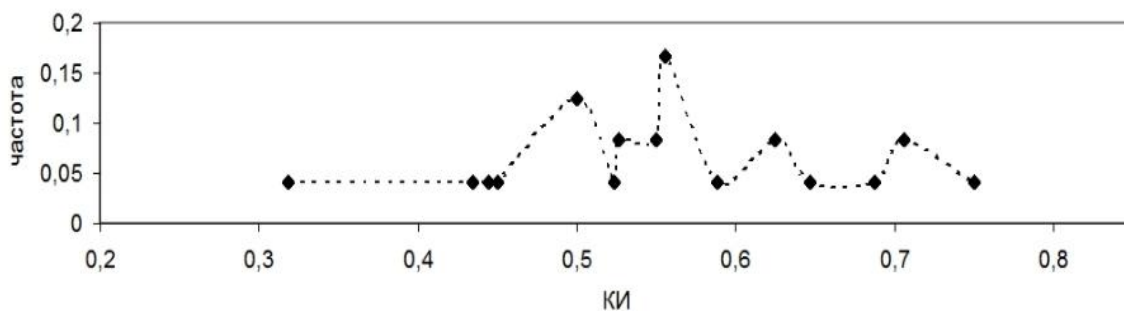
Для пчел 1-5UD_S наблюдалась частоты встречаемости КИ в области высоких значений КИ>0,55. По данным анализа мтДНК пчелы 2UD_S, 3UD_S, 4UD_S представляют примеры чистой среднерусской породы. В выборке 2UD_S у одной особи наблюдалась гетероплазмия PQ/p3xQ. Выборки 1 и 5 UD_S оказалась помесными с южными породами (скорее всего, по данным

морфометрии – распределения частот КИ (рис. 1)), с карпатской породой пчел (табл. 1).

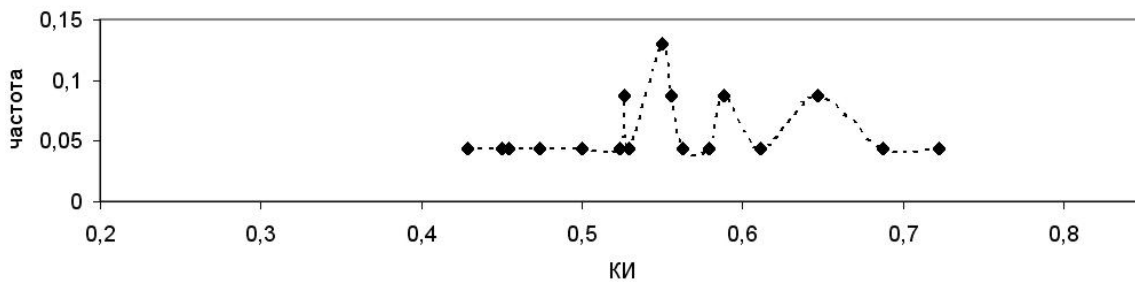
1UD_S



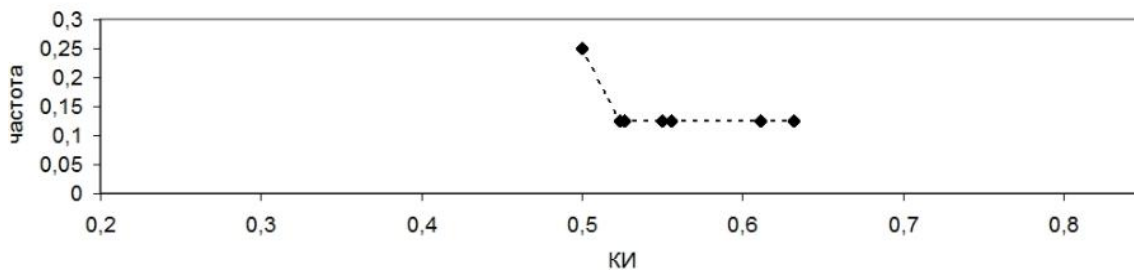
2UD_S



3UD_S



4UD_S



5UD_S

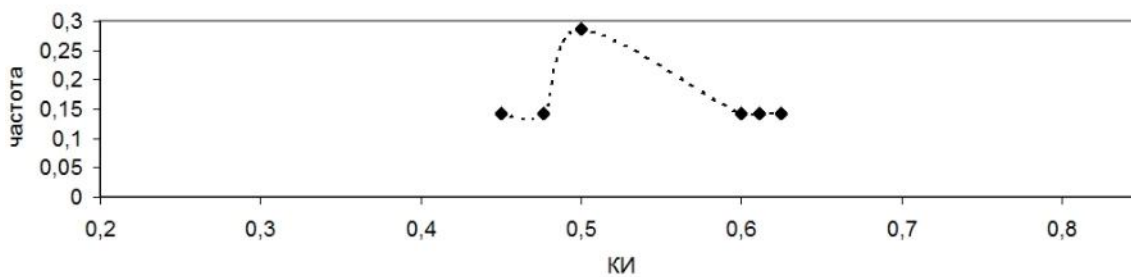


Рисунок 1 Распределение частоты встречаемости КИ в выборках пчел.

Такое же снижение среднего значения КИ до 5,25% при одновременном выявлении митотипа PQ, характерного для южных пород наблюдалось и для урбанизированных районов республики Башкортостан [4] со степенью метизации, достигающей 50%. Однако, как и в удаленных районах со слабой населенностью Удмуртии (выборки 2 и 3), так и для лесных районов Башкортостана (бурзятинская популяция, заповедник Шулган-Таш) [4], имела место высокая степень чистопородности среднерусской пчелы (частота митотипа PQQ не менее 0,99).

Для оценки распространенности РНК-содержащих вирусов в Удмуртии были целенаправленно отобраны образцы биологического материала на пасеках, где погибло не менее 20% пчелиных семей, и не менее 37% из них были поражены варрозом. Обнаружено, что наиболее распространенным вирусом является DWV (7 случаев, 23,3%), который наиболее часто встречается в семьях пчел, пораженных *V. destructor* [8, 9]. В меньшей степени обнаружен ABPV (4 случая, 13,3%) и SBV (4 случая, 13,3%). Количество вирусов, не менее 2-х одновременно обнаруженных составляло 4 случая (13,3%), не менее 2-х 1 случай (3,3%): ассоциации DWV-SBV и DWV-ABPV соответственно.

В работах Береней О. с соавторами и Миранда Дж. с соавторами также выявлены комбинативные инфекции DWV-ABPV, DWV-ABPV-SBV, DWV-SBV-ABPV, DWV-ABPV-SBV-BQCV, DWV-ABPV-BQCV, DWV-SBV, DWV-BQCV, DWV-SBV-BQCV [8, 9]. Известно, что такие комбинации, вероятно, играют значительную роль в распространении явления “коллапса” пчелиных семей (CCD), приводя к высокой вероятности гибели всей пчелиной семьи, особенно в момент весеннего размножения и создавая угрозу для сохранения пчел.

Выводы

Таким образом, нами был проведен анализ чистопородности одновременно при помощи морфометрического анализа и генетического маркера мтДНК, установлена степень чистоты исследуемых популяций с точностью до одной семьи. Выявлено, что не все представленные популяции пчел представляют чистую породу и метизированы. Также обнаружено, что в Удмуртии присутствует инфицирование пчел РНК-содержащими вирусами, приводящими к летальному исходу. В большинстве выборок наблюдается комбинированная инфекция, которая усугубляет эпизоотическую ситуацию, так как опасность гибели пчелиной семьи при комбинированной инфекции возрастает.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009-2013» по Госконтракту «Молекулярно-генетический анализ биоразнообразия растений, животных и человека» 14.740.12.0826 (2011-1.4-501-001).

Библиографический список

1. Кузьмичев В.Е., Гришин О.С. Изучение корреляции морфологических и этологических признаков местной популяции медоносной пчелы // Известия калужского общества изучения природы: книга восьмая. Сборник научных трудов. 2008. КГПУ. С.194-219.
2. Непейвода С.Н., Колбина Л.М., С.Л. Воробьева, Санникова Н.В., Масленников И.В., Ильясов Р.А., Николенко А.Г. Анализ дифференциации популяции *Apis mellifera* в Удмуртии // Пчеловодство. 2011. №10. С.12-13.
3. Колбина Л.М., Непейвода С.Н., Воробьева С.Л., Санникова Н.А., Масленников И.В., Ильясов Р.А., Николенко А.Г. Генетическая дифференциация популяции медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в Удмуртской республике // Аграрная наука Северо-Востока. №6. 2011. С.46-48.
4. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г., Вахитов В.А. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала // Генетика. 1998. Т.34. №11. С.1574-1577.
5. Бородачев А.В., Бурмистров А.н., Касьянов А.И., Кривцова Л.С., Кривцов Н.И., Лебедев В.И., Мартынов А.Г., Соловьева Л.Ф., Харитонов Н.Н. Методы проведения научно-исследовательских работ в пчеловодстве // Рыбное, НИИП. 2002. С.1-154.
6. Guillemaud T., Ciosi M., Lombaert E., Estoup A. Biological invasions in agricultural settings: Insights from evolutionary biology and population genetics // C. R. Biologies. 2011. V.334. P.237-246.
7. Кривцов Н.И., Горячева И.И., Удина И.Г., Бородачев А.В., Монахова М.А. Идентификация пород и популяций медоносной пчелы с использованием метода ПЦР // Сельскохозяйственная биология. 2010. № 6. С.26-29.
8. Berenyi O., Bakonyi N., Derakhshifar I., Koglbberger H., Nowotny N. Occurrence of six honey bee viruses in diseased Austrian apiaries // Appl Envir Microbiol. 2006. V.72. N.4. P.2414-2420.
9. Miranda J.R., Cordoni G., Budge G. The acute bee paralysis virus- Kashmir bee virus- Israeli acute paralysis virus complex // J Invertebr Pathol. 2010. V.103. N.1. P.30-47.
10. Удина И.Г., Кунижева С.С., Гришечкин А.Е., Калашников А.Е., Учаева В.С., Кривцов Н.И., Злобин В.И. Обнаружение вируса деформации крыла у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на пасеках в Московской области методом ОТ-ПЦР // Вопросы вирусологии. 2010, №5. С.37-40.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ III ИНТРОНА ГЕНА ТИЭСТЕРАЗЫ СИНТАЗЫ – S АЦИЛ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (S-AFAST) УТОК

Ключевые есть: ДНК-полиморфизм, популяция, утки, генетическая структура, линия, генетической сходство

Молекулярно-генетические маркеры имеют огромное значение при исследовании и сохранении генофонда локальных пород сельскохозяйственных видов.

ДНК-полиморфизм обусловлен изменениями в ДНК, приводимым к появлению (исчезновению или изменению взаиморасположения) сайтов узнавания для рестриктаз. Анализ ПДРФ – полиморфизма позволяет также получить достаточно четкие представления об уровне генетической гетерогенности изучаемых популяций и оценить произошедшие в ходе селекции микроэволюционные процессы.

Для изучения ПДРФ – полиморфизма использован ген, контролирующий синтез фермента тиэстеразы синтазы S-ацил жирных кислот, который принимает участие в выработке маслянистого секрета копчиковой железы у птиц. Этот ген состоит из 6 экзонов и 5 интронов. Общая протяженность гена 9138 пар нуклеотидов (пн). Третий интрон имеет протяженность 1061 пн. и несколько сайтов рестрикции для эндонуклеаз Msp I, Dde I, Alu I и Hae III.

Материалом исследования послужили утки пекинской и мускусной пород различных линий Благоварского ГУП ППЗ.

На рисунке 1 представлены спектры рестрикционных фрагментов, полученных при гидролизе амплифицированного III интрона рестриктазой Msp I. Можно видеть, что эндонуклеаза Msp I выявляет четкие межпородные различия. Так, для линий, представленных пекинской породой, основная масса рестрикционных фрагментов имеет длину от 800 до 1000 пн. (рисунок 1А и 1Б), тогда как для линий мускусной породы характерными являются фрагменты длиной от 100 до 500 пн. (рисунок 1С). Вместе с тем, во всех образцах, независимо от породной принадлежности, выявлены фрагменты длиной 80 пн. Всего при использовании рестриктазы Msp I выявлено 3 типа рестрикционных морф у линий пекинской породы и 4 типа рестрикционных морф у линий Ю1 – Ю4 мускусной породы.

В изучении генетической структуры природных и сельскохозяйственных популяций используются различные методы, позволяющие получить представление о генетической подразделенности популяций и о характере филогенетических взаимоотношений между ними.

Среди этих методов основное место занимают методы оценки генетических расстояний. В таблице 1 представлена матрица генетических

расстояний, рассчитанная по методу Нея (1978) на основе встречаемости Msp I – рестрикционных фрагментов III интрона гена S-AFAST.

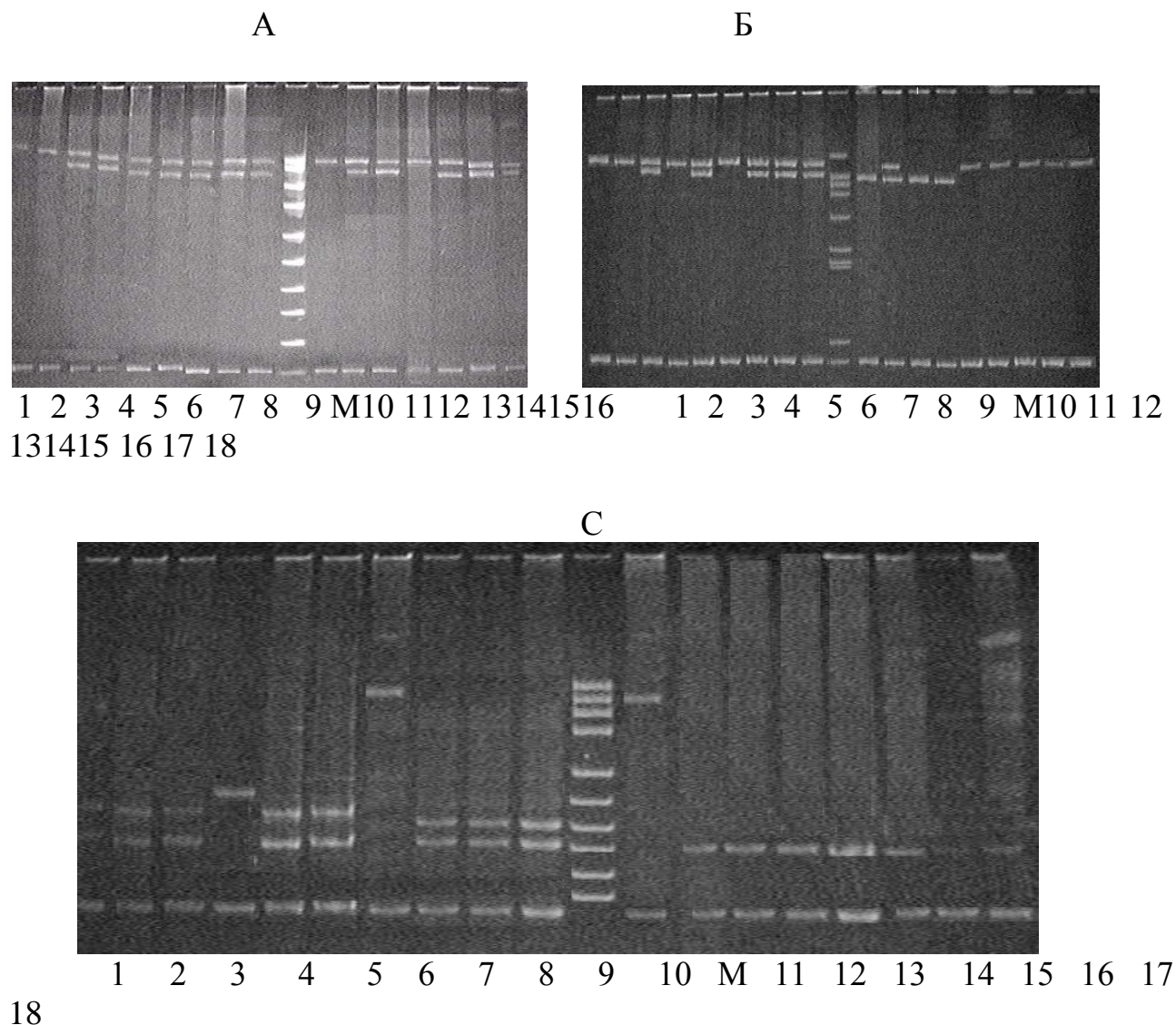


Рисунок 1 Спектры рестрикционных фрагментов амплифицированного III интрона гена S-AFAST уток, полученных при его гидролизе рестриктазой Msp I: А) 1-5 - Б1; 6-9 – Б2; 10-13 – БЦ1; 14-16 – БЦ2; Б) 1-5 – М1; 6-9 – М2; 10-14 – П2; 15-18 – П4; С) 1-5 - Ю1; 6-10 – Ю2; 11-14 – Ю3; 15-18 – Ю4; М – маркер молекулярных масс («100 бр ДНК маркер»)

Из таблицы видно, что рестриктаза Msp I не выявляет никакого генетического сходства между утками пекинской и мускусной породы, в то время как внутривидовые коэффициенты генетического сходства достаточно высоки. Так, между линиями пекинской породы кросса Медео М1 и М2) и кроссом Благоварский (Б1 и Б2) отмечен самый высокий уровень генетического сходства (0,51 и 0,67 соответственно). Также значительное сходство имеется между линиями М1 – Б1 (0,69) и М2 – Б2 (0,65). Это обусловлено тем, что

линии Б1 и Б2 кросса Благоварский были выведены на базе линий М1 и М2 кросса Медео. Линии БЦ1 и БЦ2 Башкирской цветной породы уток отличаются от них более значительно (коэффициенты генетического сходства между БЦ1 и линиями М1 и Б1 составляют соответственно 0,52 и 0,48, а между линиями БЦ2 и М2, Б2 – 0,49 и 0,47).

Таблица 1. Матрица генетических расстояний рассчитанная на основе встречаемости Msp I – рестриционных фрагментов III интрона гена S-AFAST

	Б1	Б2	М1	М2	БЦ1	БЦ2	Ю1	Ю2	Ю3	Ю4	П2	П4
Б1	-	0.67	0.69	0.64	0.48	0.50	0	0	0	0	0.56	0.66
Б2		-	0.50	0.65	0.32	0.47	0	0	0	0	0.48	0.65
М1			-	0.51	0.52	0.65	0	0	0	0	0.58	0.64
М2				-	0.27	0.49	0	0	0	0	0.45	0.63
БЦ1					-	0.53	0	0	0	0	0.30	0.25
БЦ2						-	0	0	0	0	0.33	0.50
Ю1							-	0.55	0.67	0.65	0	0
Ю2								-	0.54	0.66	0	0
Ю3									-	0.52	0	0
Ю4										-	0	0
П2											-	0.60
П4												-

На основе матрицы генетических расстояний был проведен кластерный анализ и построена дендрограмма, отражающая филогенетические отношения между изученными линиями. Как и следовало ожидать, линии Б1 и Б2 Благоварского кросса образовали с линиями М1 и М2 «прародительского» кросса Медео две отдельные ветки дендрограммы. Это свидетельствует об относительной однородности названных линий по Msp I-рестриционному полиморфизму изучаемого интрона гена S-AFAST.

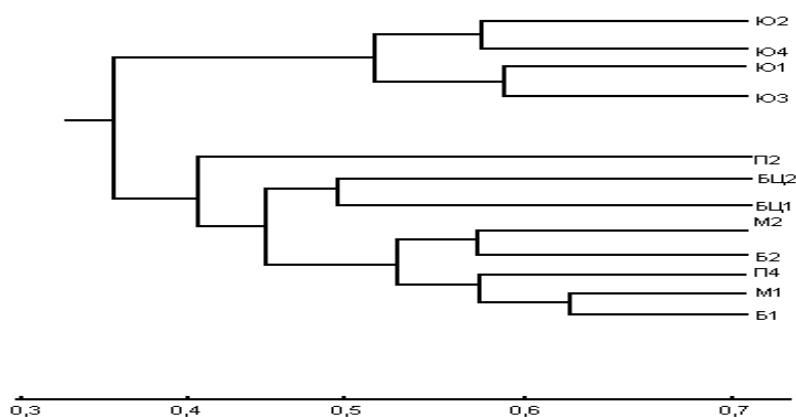


Рисунок 2. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между изученными линиями уток, по данным Msp I - полиморфизма III интрона гена S-AFAST

Линии БЦ1 и БЦ2 Башкирской цветной породы также образовали отдельную ветвь, к которой примыкает субпопуляция П2. Эта субпопуляция представлена группой цветных уток, которая появилась в стаде белых пекинских и послужила основной для выведения Башкирской цветной породы. Забор крови у этих уток произведен в начале селекционного процесса.

Еще одна отдельная ветвь, практически не связанная с остальными ветвями дендрограммы, образована линиями Ю1 – Ю4 мускусных уток.

Можно сделать вывод, рестриктаза Msp I в разных линиях уток выявляет различный уровень генетического полиморфизма III интрона гена S-AFAST и соответственно этому, несколько отличающиеся коэффициенты генетического сходства между линиями.

Библиографический список

1. Мельникова М.И. Исследования полиморфизма и дивергенции геномной ДНК на видовом и популяционных уровнях /М.И. Мельникова, В.В. Гречко, Б.М. Медников // Генетика.-1995.-Т.31, № 8.-С.1120-1131.

2. Левонтин Р. Генетические основы эволюции /Р. Левонтин. – М.: Мир.: 1978.-351с.

3. Суходолец В.В. Биологический прогресс и природа генетических рекомбинаций /В.В.Суходолец.-М.: Наука, 1995.-156с.

УДК 619:577.12+636.2

Люханов М.П., Короткевич О.С.

ФГБОУ ВПО НГАУ г. Новосибирск, Россия.

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TNF-А В ПОПУЛЯЦИЯХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ключевые слова: фактор некроза опухоли-альфа, однонуклеотидный полиморфизм, крупный рогатый скот.

Введение. Фактор некроза опухолей- альфа (TNF- α) – это белок с молекулярной массой 17 кДа, который синтезируется моноцитами /макрофагами, нейтрофилами, Т-лимфоцитами, натуральными киллерами, тучными клетками и обладает широким спектром биологического действия. Название этого белка произошло от его противоопухолевой активности, связанной с геморрагическим некрозом. Этот цитокин играет ключевую роль в развитии воспалительного ответа: инициирует синтез IL-1, IL-6, служит хемоаттрактантом для нейтрофильных гранулоцитов, активирует макрофаги, а также стимулирует пролиферацию Т- и В-лимфоцитов [2].

В современной терминологии фактором некроза опухоли называют белок, ранее называвшийся «фактор некроза опухоли-альфа» (ФНО- α). Впрочем, до

сих пор иногда используется старый термин ФНО-альфа, хотя ФНО и ФНО-альфа означают один и тот же белок. ФНО является прототипом для целого суперсемейства, которое включает 19 различных белков, служащих лигандами для 29 рецепторов. Один из членов этого суперсемейства, лимфотоксин-альфа, ранее назывался ФНО-бета (ФНО-β).[5]

ФНО синтезируется как мембранный белок с молекулярной массой 26 кДа (233 аминокислоты). После действия специфической металлопротеазы, т.н. ФНО-конвертирующего фермента (ADAM17), мембрано-связывающий фрагмент отщепляется и образуется растворимый ФНО с молекулярной массой 17 кДа (157 аминокислот). Активной формой белка является гомотример, теряющий активность при диссоциации субъединиц, так как только тример способен связываться с рецептором и олигомеризовать его, что необходимо для запуска сигнального пути. Молекула цитокина образует бета-складчатую структуру.[6]

Цитотоксическое действие ФНО на опухолевую клетку связано с деградацией ДНК и нарушением функционирования митохондрий. Литический эффект ФНО усиливается в присутствии интерферона. Один из механизмов синергического действия двух этих цитокинов состоит в усилении экспрессии рецепторов к ФНО на опухолевых клетках под влиянием интерферонов[7]

Активные исследования ФНО – белка фактора некроза опухоли были начаты в последнем десятилетии XIX века, когда некий врач из Нью-Йорка изучал особенности феномена геморрагического некроза саркомы. Лечение болезни было осложнено присоединением стрептококковой интеркуррентной инфекции. В ходе исследований, целью которых была индукция геморрагического некроза опухолей, 160 онкобольных получили бактериальный препарат стрептококков и убитых *Serratia*, названный впоследствии «Токсином Коли».[8]

Фактор некроза опухолей был открыт в 1975 г., хотя понятие «фактор» подчеркивало лишь то, что молекулярно он был охарактеризован только частично как белковая или белоксодержащая субстанция, производимая макрофагами в ответ на активацию эндотоксином[4].

Ген, кодирующий выработку белка TNF-α у крупного рогатого скота находится на 23 хромосоме, локусе 23q22. На данный момент известно около 30 полиморфных участков гена TNF-α, однако, не все они изучены в полной мере. В настоящее время известно большое количество работ по изучению нуклеотидного разнообразия на уровне последовательностей ДНК.[9] Активно изучается нуклеотидный полиморфизм фактора некроза опухолей (ФНО). Наиболее полно изучен нуклеотидный полиморфизм TNF-α по -308G/A положению. Однако нас интересует однонуклеотидный полиморфизм TNF-α по -824G/A положению и его влияние на молочную продуктивность КРС[1].

Цели и задачи исследования

Изучить частоту однонуклеотидного полиморфизма -824 A/G гена TNF-α в популяциях крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Для исследований были взяты пробы крови у 82 лактирующих коров чернопестрой породы приобского типа. ДНК выделяли стандартными методами использования протеолитической, а затем фенольной экстракции (крови). Фрагмент 5'-фланкирующие регион крупного рогатого скота ген TNF-alpha между позициями 3090 и 3234 (GenBank присоединения нет. Z14137) усиливается с геномной ДНК с помощью ПЦР с использованием прямого праймера 5'-CCGAGAAATGGGACAACCT-3 'и обратного праймера 5'-GCCATGTATCCCCAAAGAAT-3 '. Продукт амплификации переваривали ферментом EcoICRi (СибЭнзим, Россия), а затем представлен в полиакриламидном геле.

Результаты исследования

Среди исследованных коров было выявлено: коров с генотипом G/G-27, коров с генотипом A/G-39, коров с генотипом A/A-14. Затем были обработаны данные по первым 4 лактациям. Полученные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1. Частота аллелей и генотипов гена TNF-α у крупного рогатого скота

	генотип			аллели	
	A/A	G/A	G/G	A	G
частота	16(19,51)	39(47,56)	27(32,93)	71 (43,3)	93 (56,7)

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что аллели A/G встречаются в популяции примерно в равных пропорциях.

Выводы

Выявлена частота однонуклеотидного полиморфизма гена TNF-α по 824 положению в популяциях крупного рогатого скота. Однако так как мы не располагаем данными по полиморфизму -308 A/G и других полиморфных участков гена TNF-α этих коров, то целесообразно исследовать их по этим показателям, чтобы исключить его влияние этих факторов. В этом случае является целесообразным проведение селекционного отбора крупного рогатого скота с использованием генетических маркеров по полиморфизму -824 A/G гена TNF-α, в особенности племенных быков. Также требуются дополнительные исследования биохимических и гематологических показателей крупного рогатого скота с учетом их генотипа.

Библиографический список

1. Недоспасов С.А., Шахов А.Н., Турецкая Р.Л. и др. Молекулярное клонирование генов человека, кодирующих факторы некроза опухолей: тандемное расположение альфа- и бета-генов в коротком сегменте (6 тыс. пар нуклеотидов) генома человека.// Докл. Акад Наук СССР.— 1985. — Т.285. —С. 1487-1490.
2. Недоспасов С.А., Купраш Д.В. Фактор некроза опухолей и лимфотоксин: физиологические функции и значение для цитокиновой и анти-

- цитокиновой терапии.// Русский мультидисциплинарный журнал – 2008. Т. – 12, № 1 С.— 69-76.
3. Mullar C. Coffey T.J. Coss M. Teifke J.P. Langhans Werling W.D. Lack of TNF alpha supports persistence of a plasmid encoding the bovine leukemia virus in TNF -/- mice. // Vet. Immunol. Immunopathol.— 2003. – №92 .—pp. 15-22.
 4. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика.// Новосибирск. 2002.
 5. Рыдловская А.В. Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм гена TNF α и патология.// Цитокины и воспаление. –2005.- Т. 4.— № 3. –С. 4—10.
 6. Jones D.E., Watt F. E., Grove J. et al. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism in primary biliary cirrhosis// J. Hepatol. –1999.—Vol.30.— №2.—pp. 232-236.
 7. Greig PC, Herbert WNP, Robinette BL, Teot LA: Amniotic fluid interleukin-10 concentrations increase through pregnancy and are elevated in patients with preterm labor associated with intrauterine infection.// Am J Obstet Gynecol, - 1995.— pp.—173-1223,.
 8. Satoru Konnai, Tatsufumi Usui, Manabu Ikeda. et al. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection.// Microbes and infection.— 2006. –№8.—pp.2163—2171.
 9. Симбирцев А. С. Цитокины – новая система регуляции защитных сил организма // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т.1.-№ 1. – С. 9-16.

УДК 575.17: 599.9: 575.822

Плотникова Е.Ю.,¹ Прудникова А.С.², Калашников А.Е., Учаева В.С. ², Васильев Ю.А.¹

¹ ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет»

² ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ РАСЩЕЛИНАМИ ГУБЫ И НЕБА НА ОСНОВЕ МЕДИЦИНСКОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ И АНАЛИЗА ДИСПАНСЕРНОЙ БАЗЫ

Ключевые слова: врожденные расщелины губы и неба, рост при рождении, вес при рождении, группы крови, возраст матери, Краснодарский край

Актуальность. Актуальность исследования состоит в том, что врожденные пороки развития (ВПР) челюстно-лицевой области (ЧЛО) - расщелина губы и / или неба (РГ, РГН и РН) - одни из наиболее широко распространенных тяжелых ВПР. Необходима разработка мер по снижению их частоты в популяции и их профилактике.

Цель. Изучить спектр и динамику диагнозов ВПР ЧЛО по диспансерной базе (1985-2009гг.), созданной на кафедре детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии ГОУ ВПО КГМУ, изучить по данным

медицинской документации и анкетирования морфо-физиологические и генетико-демографические факторы, связанные с риском ВПР ЧЛО.

Результаты работы.

Анализ диспансерной базы. Сведения о детях с ВПР ЧЛО (ВРГ, ВРН и ВРГН) и их матерях получены из диспансерной компьютерной базы данных, созданной на кафедре детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздравсоцразвития России при участии сотрудников ИОГен РАН (Шульженко и др., 2006, 2010). Для Краснодарского края выявлена частота расщелин губы и/или неба, составившая 1,01 на 1000 новорожденных (Панкова и др., 2009).

Анализ компьютерной базы позволил выявить 1297 детей с ВПР ЧЛО Краснодарского края с указанием района проживания, которые были поставлены на диспансерный учет, начиная с 1985 (единицы - с 1978г.) по 2009г. Кроме того, было выявлено 111 детей, проживающих в различных районах Адыгеи, из которых у 51% установлен диагноз расщелина верхней губы и неба. Диагнозы (ВРГ, ВРН и ВРГН) распределились следующим образом: у мальчиков 25,2%, 31,1% и 43,7%; у девочек 22,6%, 35,8% и 41,6% и в суммарной группе 24,0%, 33,3% и 42,7% за все годы, соответственно. Таким образом, у мальчиков наблюдали некоторое повышение диагноза ВРГ, а у девочек – ВРН. Изучена динамика накопления детей с ВПР ЧЛО в базе данных по годам в зависимости от пола и диагноза. Выявлены достоверные различия по соотношению диагнозов у мальчиков и девочек в суммарной группе ($S=0,14$, $t=2,533 > 1,96$), отмечен избыток мальчиков, составивший в среднем 1,15:1. Проведено сопоставление распределения диагнозов, в том числе по полу, и в суммарной выборке за три временных периода: 1985 (малочисленные данные с 1975г)-1991, с 1992-2000гг. и 2000-2009гг. Выявлена следующая динамика изменения соотношения диагнозов за эти три периода: ВРН:ВРГ(три периода), ВРГН:ВРГ(три периода): у мальчиков 1,3:1,4:1,0 и 1,5:2,1:1,7; соответственно, у девочек 1,3:1,5:2,0 и 1,6:2,0:1,9; соответственно, и в суммарной выборке 1,3:1,4:1,4 и 1,5:2,0:1,8, соответственно. Полученные распределения диагнозов указывают на рост тяжелых диагнозов ВРН (у девочек), а также ВРГН в суммарной группе (и у мальчиков и девочек) по отношению к более легкому диагнозу ВРГ, что требует неотложных мер по установлению причин такой динамики. Возможно, изменения в спектре диагнозов связаны с экологическими факторами.

Проведено распределение детей с ВПР ЧЛО в базе по районам Краснодарского края: выявлены районы с более высокой рождаемостью ВПР ЧЛО и более низкой. При проведении анализа пространственно-территориального распределения ВПР ЧЛО у детей в Краснодарском крае все случаи ВПР ЧЛО, включенные в базу данных, были сгруппированы по административно-территориальным единицам края (48) в соответствии с местом проживания семьи; значения были нормированы на численность

населения соответствующей единицы. Территории с более высокими значениями расположены в основном в центральной части края в бассейне р. Кубань; преобладает сельское население, в структуре производства преобладает сельское хозяйство. Исключение представляет г.Кропоткин.

Морфофизиологические признаки. Данные по морфофизиологическим признакам (вес, рост при рождении) получены из медицинских карт детей с ВПР ЧЛО. Статистическая обработка данных проведена с помощью программы “Statistica.”

Среди детей с ВПР ЧЛО отмечена большая доля недоношенных, по сравнению с контрольной группой, соответственно, 20% и 3%. Установлены достоверные различия в распределениях весоростовых признаков при рождении. У детей с ВПР ЧЛО средняя длина тела составила $51,32 \pm 0,3$ см ($\sigma = 3,31$) (N=126), средний вес – $3203,48 \pm 47,97$ г ($\sigma = 577,68$) (N=145), а в контрольной группе средняя длина тела составила $52,16 \pm 0,22$ см ($\sigma = 2,60$) (N=139), средний вес – $3394,58 \pm 40,85$ г ($\sigma = 485,03$) (N=141). Распределения весоростовых признаков в группе больных детей асимметричны и характеризуются накоплением частот в зоне низких значений признака. Таким образом, группа детей с ВПР ЧЛО отличается от контрольной группы более низкими средними значениями длины тела и веса при рождении, более высокими значениями дисперсии обоих признаков и меньшей долей детей со средними значениями признаков (Курбатова и др. 2011).

Возраст матери при рождении ребенка. Анализ возрастного распределения матерей, родивших детей с ВПР ЧЛО в период с 1978 по 2009 гг. (N = 999), показал, что для всей группы средний возраст матери составляет $25,99 \pm 0,18$ лет ($\sigma = 5,72$); для матерей, родивших детей с ВПР ЧЛО в 2002-2009 гг., средний возраст составляет $26,38 \pm 0,27$ лет ($\sigma = 5,73$) (Курбатова и др. 2011). Для оценки влияния фактора возраста матери на риск рождения ребенка с ВПР ЧЛО распределение возрастов матерей больных детей, родившихся в период с 2002 по 2009 г., было разделено на возрастное распределение матерей в Краснодарском крае по официальным статистическим данным за аналогичные годы (Шульженко и др., 2009).

Выявлено, что риск рождения ребенка с ВПР возрастает для матерей старше 35 лет, особенно значительно – для матерей старше 40 лет; небольшое увеличение риска отмечается и для очень молодых матерей (моложе 20 лет). По данным демографической статистики, в Краснодарском крае наблюдается увеличение среднего возраста матерей, которое составило за период с 2001 по 2008 гг. ровно год (цит. по Шульженко и др. 2010). При сохранении такой тенденции можно ожидать некоторого роста частоты рождения детей с данной патологией.

Группы крови. Распределение групп крови систем АВО и Rhesus и изучены по данным медицинских карт детей с ВПР ЧЛО, частоты по АВО представлены на рисунке. Статистическая обработка данных проведена с помощью программы “Statistica 6.”

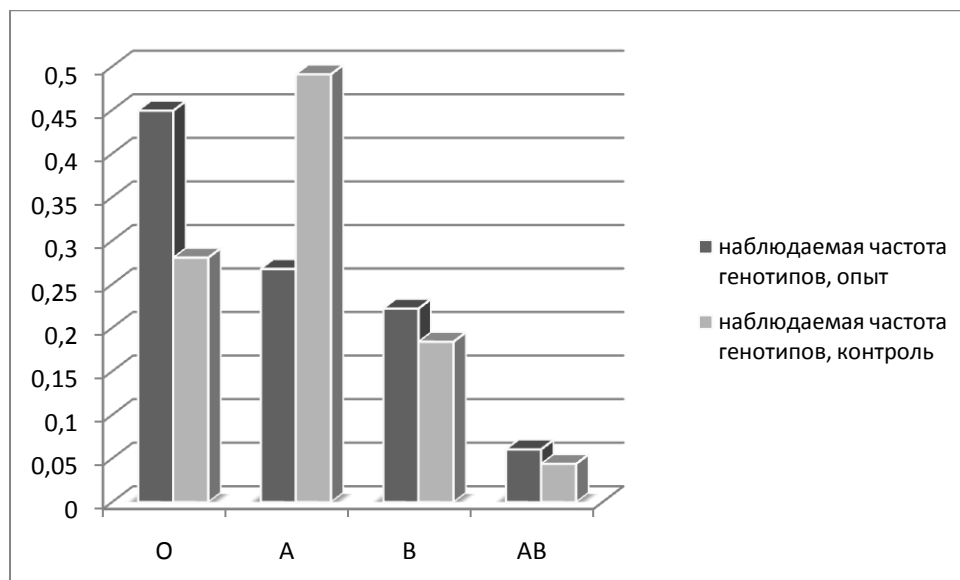


Рис. Распределение частот групп крови АВО у детей ВПР ЧЛО и в контрольной группе.

По системе АВО в обеих группах не наблюдали отклонений от равновесия Харди-Вайнберга. Выявлены достоверные различия по распределению групп крови между больными и здоровыми детьми ($\chi^2=16,15$, $d.f.=3$; $P<0,001$).

У детей с ВПР ЧЛО более высокая частота группы крови О(І) и более низкая частота группы А(ІІ), по сравнению с контролем (соотношение частот группы крови А(ІІ) к О(І) у больных – 0,59, у здоровых – 1,75). По системе Rhesus не выявлено достоверных различий между детьми с ВПР и здоровыми. Относительный риск для детей с группой крови О(І) составил 2,94, с группой крови В(ІІІ) – 2,21 и с АВ(ІV) – 2,51. Таким образом, у детей с О(І) группой крови выше риск ВПР ЧЛО почти в 3 раза, по сравнению с детьми с группой А(ІІ).

Заключение. Дети с расщелиной губы и/или неба отличаются от контрольной группы более низкими значениями веса и длины тела при рождении, большей долей недоношенных и меньшей долей детей со средними значениями весоростовых признаков. Присутствие большого числа недоношенных среди детей с расщелинами губы и/или неба в Краснодарском крае предполагает необходимость разработки комплекса мер по профилактике преждевременных родов у матерей с высоким риском ВПР ЧЛО плода, что важно для снижения смертности таких детей, так как помимо их пониженной жизнеспособности следует отметить и более медленный набор ими веса в раннем возрасте из-за сложностей кормления. Группа крови О (І) ассоциирована с ВПР ЧЛО в Краснодарском крае. Относительный риск рождения ребенка с расщелиной губы и/или неба существенно возрастает для матерей старше 35 лет (более 50%) и менее заметно для матерей моложе 20 лет (почти на 20%). Следовательно, возраст матери действительно является фактором риска рождения ребенка с ВПР ЧЛО в Краснодарском крае. Успехи

медицины по реабилитации недоношенных младенцев с ВПР ЧЛО и их хирургическому лечению в совокупности с “постарением” матерей способствуют прогнозируемому увеличению частоты изученных ВПР ЧЛО в последующих поколениях. Установленная возрастная зависимость предполагает возможность профилактики ВПР ЧЛО посредством медико-генетического консультирования семей, планирующих рождение ребенка. Благодарности. Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-96573-р_юг_ц.

Библиографический список

Курбатова О.Л., Васильев Ю.А., Прудникова А.С. и др. Изменчивость морфофизиологических и генетико-демографических признаков в группе детей с врожденными расщелинами губы и неба // Генетика. 2011. Т. 47. №11. 1514-1522.

Панкова Е.Е., Матулевич С.А., Голубцов В.И. Мониторинг врожденных пороков развития в Краснодарском крае // Кубанский научный медицинский вестник. 2009. №1. С. 79-82.

Шульженко В.И., Верапатвелян А.Ф., Плечова Е.А. и др. Статистический анализ врожденной патологии лица у детей Краснодарского края // Кубанский научный медицинский вестник. 2006. № 5-6 (86-87). С. 122-123.

Шульженко В.И., Васильев Ю.А., Курбатова О.Л. и др. Разработка подходов к оценке генетических факторов риска рождения детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области в Краснодарском крае // Кубанский научный медицинский вестник. 2010. №2 (116). С. 107-111.

УДК 619 (03)

Сафаргалин А.Б., Абдулгазина Н.М., Юмагужин Ф.Г.
Зауральский филиал Башкирский ГАУ, г. Сибай

СТЕПЕНЬ ГИБРИДИЗАЦИИ БУРЗЯНСКОЙ БОРТЕВОЙ ПЧЕЛЫ В ПРЕДЕЛАХ АРЕАЛА

Ключевые есть: бурзьянская бортевая пчела; изоферментный анализ; гибридизация

Усиливающаяся неконтролируемая гибридизация приводит деградации внутривидовой изменчивости локальных популяций и последующему снижению адаптационного потенциала и иммунитета [1]. Бурзьянская бортевая пчела, будучи исключительно приспособленной к суровым горно-лесным условиям и короткому бурному медосбору с липы служит ценным генетическим фондом отечественного пчеловодства [2].

Цель и задачи исследования. Выявление степени метизации бурзьянской бортевой пчелы в пределах ареала является актуальной проблемой.

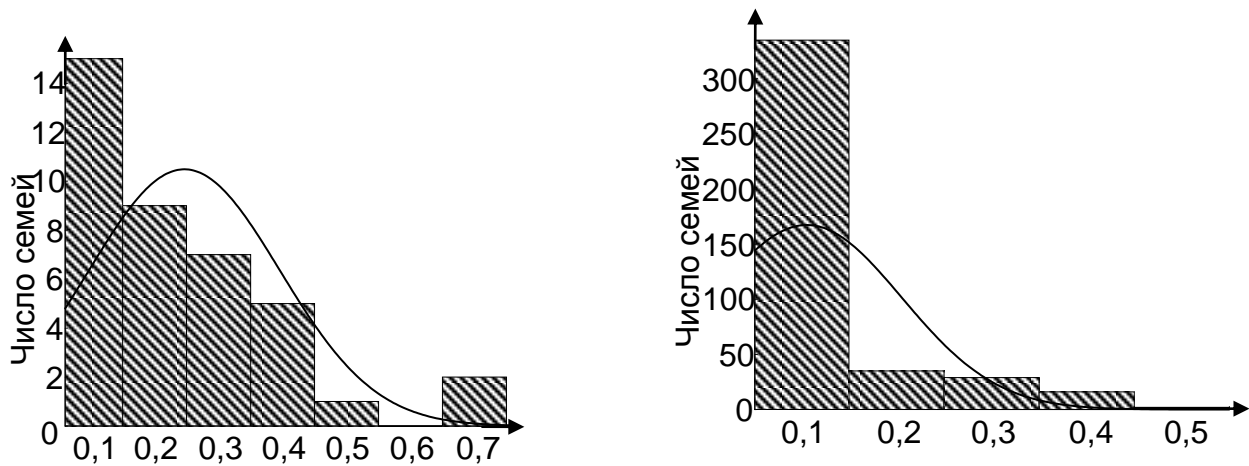
Материалы и методы исследования. Для изучения изоферментов у медоносных пчел использован метод полиакриламидного диск электрофореза со щелочным разделяющим гелем с рН 8,9 [3].

Результаты исследования. Нами в предыдущих исследованиях на медоносных пчелах был рассмотрен изоферментный состав следующих ферментов: малатдегидрогеназы MDH, малик-энзима ME, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы G6PDH, алкогольдегидрогеназы ADH, глутаматдегидрогеназы GDH, изоцетратдегидрогеназы IDH, шикиматдегидрогеназы SKDH, лейцинаминпептидазы LAP, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы 6PGD, диафоразы DIA и эстеразы EST. Среди изученных ферментов лишь у малатдегидрогеназы и эстеразы выявлен слабый полиморфизм [4], а остальные ферменты являлись полностью мономорфными по обнаруженным зонам или не проявляли активности.

На электрофореграммах MDH рабочих пчел бурзянской популяции гистохимически окрашивается в виде трех зон активности, из которых MDH-2 является полностью мономорфной. В двух других зонах выявлялись одно- и трехполосные фенотипы изоферментов [5], что доказывает димерность структуры фермента у *Apis mellifera*. Однако в одной из полиморфных зон (MDH-3) активность изоферментов слаба и проявляется непостоянно. Поэтому эти маркеры нами не использованы. Наиболее надежными для популяционного анализа являются аллозимы MDH-1. В основе рекомендуемого способа оценки степени гибридизации бурзянской бортовой пчелы лежит выявленный нами в 90-х годах практически полный мономорфизм соответствующего локуса. При этом обнаруживающийся полиморфизм может свидетельствовать о гибридизации и генетической экспансии извне.

В семьях пчел из Башкирского Зауралья и горно-лесной зоны Республики частоты аллеля $Mdh-1^1$ (практически отсутствовавшего у бурзянской бортовой пчелы в 1998 г.) в 2005 г. изменялись в пределах 0,222-0,750. Все это привело к тому, что гетерогенность аллельных частот статистически высоко достоверна ($P < 0.001$). Генетическое расстояние $D = 0.121$ – это уровень межвидовых различий по аллозимам. Показатель F -статистики Райта составил относительно высокую величину ($F_{st} = 0.134$), нехарактерную для внутривидового уровня. Главной причиной выявленной существенной генетической дифференциации групп семей вне ареала бурзянской бортовой пчелы, видимо, следует признать бесконтрольный завоз пчел других таксонов на территорию Республики Башкортостан [6], что приводит к гибридизации местных пчел. Доказательством является рост наблюдаемой гетерозиготности к 2010 г., особенно в отдельных семьях – феномен, не наблюдавшийся в предыдущие периоды исследований. В среднем для 116 исследованных семей параметр составил $6,44 \pm 1,15$ %, доходя до 61,50 % (коэффициент вариации 236,5 %). Генотипов $Mdh-1^{1/1}$ (сравнительно часто встречающихся за пределами ареала бурзянской бортовой пчелы) содержится в пересчете на одну полиморфную особь $0,83 \pm 0,15$ (6,38 % рабочих пчел), с изменениями от 0 до 8 (61,54 %) - коэффициент вариации 190.76 %.

Их наличие означает, что сами матки являются обладателями аллеля 1 в гомо- или гетерозиготной форме. Распределение наблюдаемой гетерозиготности приведено на рисунке 1.



А. Наблюдаемая гетерозиготность Полиморфных семей.

Б. Генетические расстояния.

Рисунок 1. Распределение семей бурзянской бортовой пчелы, полиморфных по локусу Mdh-1, по наблюдаемой гетерозиготности (А) и по генетическому расстоянию (Б)

Чаще в изменчивых семьях встречаются от 1 до 3 гетерозиготных рабочих пчел. Численности составили в среднем $2,49 \pm 0,30$ (19,15 % рабочих пчел), изменения от 1 (7,69 %) до 8 (61,54 %) на семью, коэффициент вариации 75,90%. Такая высокая межсемейная генетическая дифференциация приводит к появлению относительно высокой внутривидовой подразделенности и генетически сильно выделяющихся семей (рисунок 2).

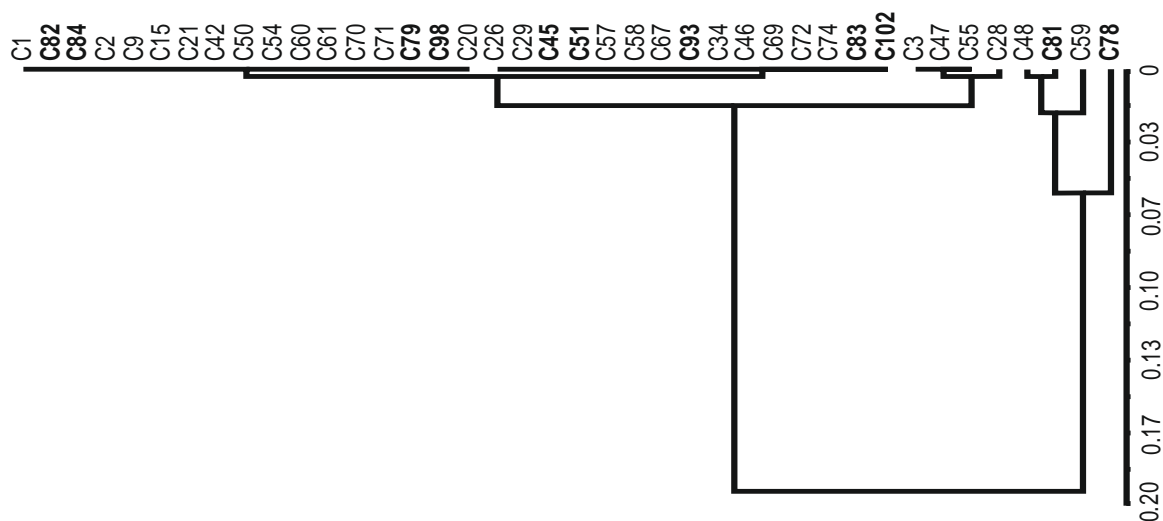


Рисунок 2. Кластеризация семей по генетическому расстоянию D

Заключение справедливо как в отношении бортовых пчел, так и семей в пасеках. Среднее генетическое расстояние Нея между 39 выборками с изменчивостью по локусу Mdh-1 составило $0,042 \pm 0,003$, с изменениями в пределах 0 – 0,385 (коэффициент вариации 226,2 %). Гибридные особи относительно равномерно распределены по территории, занимаемой ареалом бурзьянской бортовой пчелы (рисунок 4). Об этом свидетельствуют результаты автокорреляционного анализа (рисунок 3). Генетическое расстояние Грегориуса между любой парой семей не увеличивается статистически достоверно, а варьирует в пределах 95 %-ного доверительного интервала, свидетельствуя об отсутствии его связи с расстоянием между семьями.

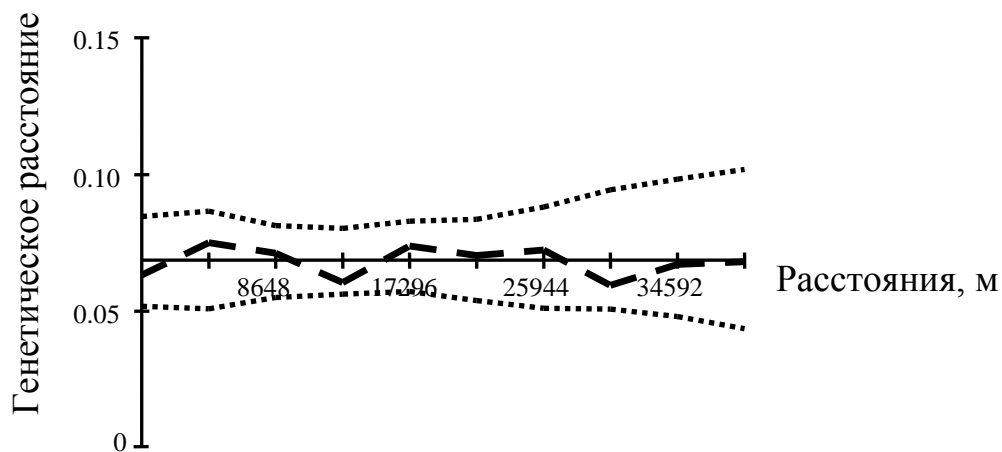


Рисунок 3. Изменения генетического расстояния D с увеличением географической дистанции между парами семей

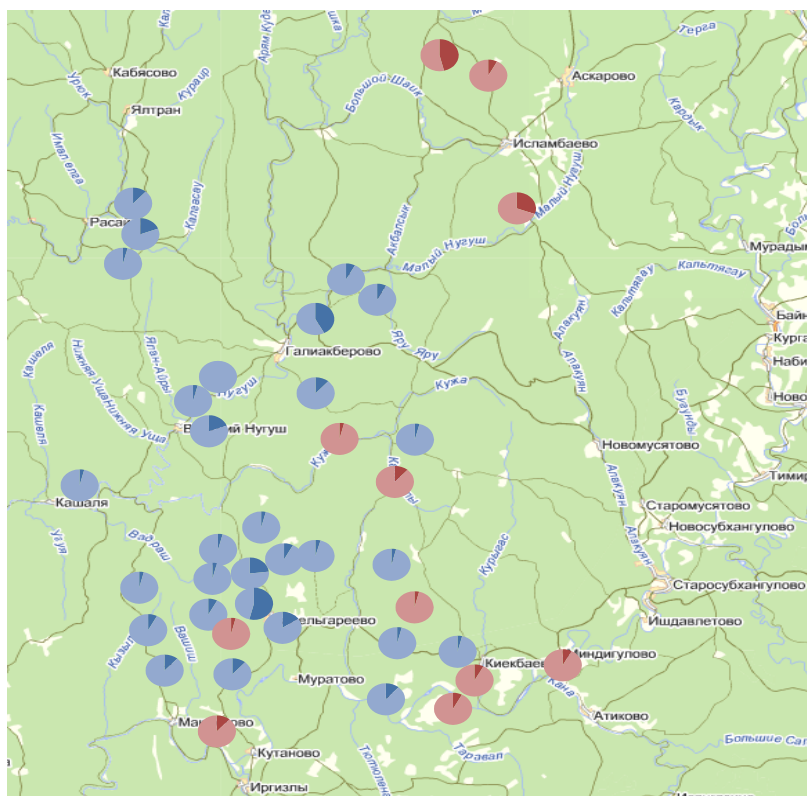


Рисунок.4. Распределение гетерозигот в ареале бурзьянской бортовой пчелы

Библиографический список

1. Юмагужин, Ф.Г. Охрана и селекция бурзянской пчелы / Ф.Г. Юмагужин // Пчеловодство и апитерапия. – 2003. №1. – С. 12 – 13.
2. Косарев, М.Н. Влияние метизации на породные особенности бортовых пчел в заповеднике «Шульган-Таш» (Южный Урал) / М.Н. Косарев, А.Я. Шарипов, Ф.Г. Юмагужин // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных: матер. междун. науч. конференции.- Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2005. – С. 112 – 114.
- 3 Davis, B.J. Disc electrophoresis. 11. Methods and application to human serum proteins / B.J. Davis // Ann. New York Acad. Sci., 1964. –V 121. –P. 404–427.
- 4 Косарев, М.Н. Полиморфизм локусов малатдегидрогеназы в бурзянской популяции пчелы медоносной(*Apis mellifera* L) / М.Н. Косарев, Ф.Г.-Урманцева, А.М.Ишемгулов, Ю.А.Янбаев, Ф.Г.Юмагужин // Изучение природы в заповедниках Башкортостана. Миасс: Геотур, 1999. С.32 - 36.
- 5 Юмагужин, Ф.Г. Генетическая изменчивость пчелы медоносной из разных регионов России // Вестник Оренбургского государственного университета №10 2009 С.222-223.
- 6 Юмагужин, Ф.Г. Морфологическая и генетическая изменчивость пчелы медоносной (*Apis mellifera mellifera* L.) в Башкирском Зауралье / Ф.Г. Юмагужин, А.Н. Талипов, Ю.А. Янбаев Ю.А. // Монография. Уфа, 2008. - 106 с.

УДК 636.237.23.082

Сахаутдинов И.Р., Муратова Л.М., Гумеров У.Р., Исламова С.Г.
ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ

АССОЦИАЦИИ ГРУПП КРОВИ С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КОРОВ

Ключевые есть: продуктивность; маркеры; антигены; группа крови; порода; адаптация

В связи с быстрым развитием иммуногенетики животных, все чаще возникает вопрос о возможной связи некоторых систем групп крови с продуктивностью. Продуктивность сельскохозяйственных животных связана с обменными процессами, протекающими в организме животных. Изучение связи полиморфных систем с продуктивными качествами животных является актуальным вопросом, поскольку может обеспечить раннее прогнозирование продуктивных качеств сельскохозяйственных животных при подборе производителей к маточному поголовью и отборе ремонтного молодняка на воспроизводство стада [1, 2, 3].

Учитывая то, что приспособление органов и систем организма к различным условиям существования выражается морфологически, а приспособительные реакции органов охватывают все системы, включая систему крови, целью наших исследований явилось изучение процессов адаптации коров симментальской породы австрийской селекции к новым эколого-хозяйственным условиям, исходя из биохимических показателей крови (антигенного состава эритроцитов).

Перед нами была поставлена задача оценить генотип коров по частоте встречаемости антигенов, и выявить связь их с хозяйственно-полезными признаками в условиях НПО «Баймакское» Баймакского района, Республики Башкортостан. Материалом исследований служили документы первичного зоотехнического учета, племенные карточки (Ф.1 и 2-МОЛ). За основу были взяты эритроцитарные антигены В-системы групп крови, так как их специфика и разнообразие отражают как индивидуальные наследственные особенности животных, так и всей породы в целом.

Сравнительным анализом частот встречаемости различных аллелей в исследуемых стадах животных выявлена следующая генетическая связь.

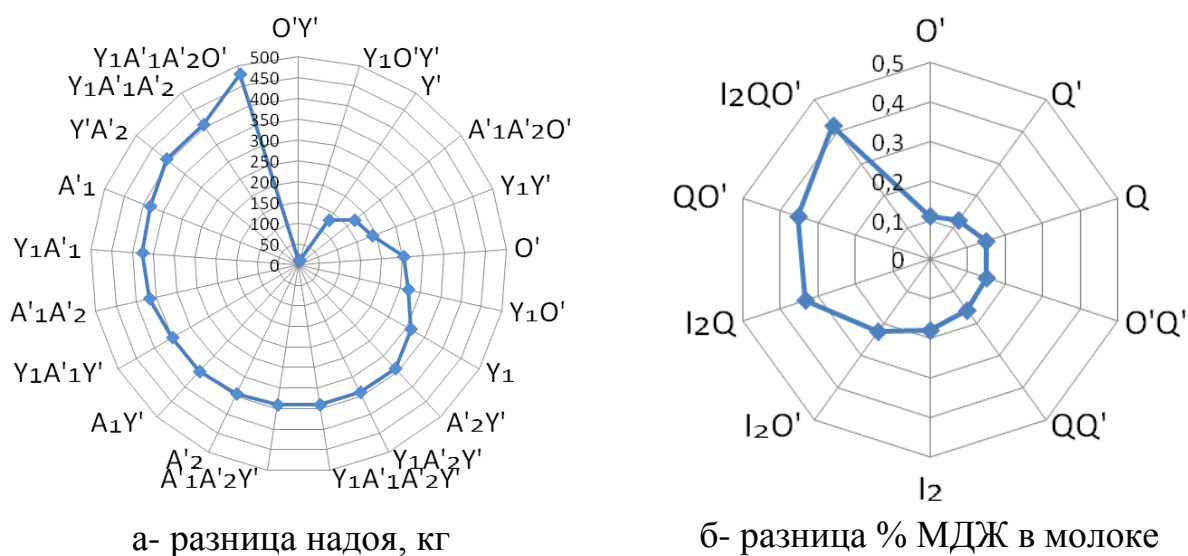


Рисунок 1 Разница надоя и % жира между группами коров носителей и не носителей определённых антигенов

Так, в стаде коров местной селекции (Рис.1а) с высоким надоем отмечались животные-носители аллелей Y_1A_1Y' ; $Y_1A_1A_2Y'$; и $Y_1A_1A_2O'$ (Рис. 1а). Их средняя продуктивность составила 3944 ± 137 кг; 3941 ± 148 кг и 4113 ± 332 кг соответственно. Надой коров-носителей этих аллелей превышал таковой у своих сверстниц - не носителей на 351 кг ($p < 0,05$), на 341 кг ($p < 0,05$) и 479 кг ($p < 0,05$).

Следует отметить, что в исследуемой популяции животных самый высокий надой был у носителей аллеля $Y_1A_1A_2O'$ (4113 ± 332 кг.), причем, у них была и довольно высокая массовая доля жира (МЖД) ($3,74 \pm 0,047\%$). Самый

низкий надой отмечен у коров-носителей аллеля O_1G' (3556 ± 165 кг), но у них же была при этом наиболее высокая МДЖ ($3,81 \pm 0,048\%$) при ($p > 0,05$).

Наиболее высокий показатель массовой доли жира (Рис. 1б) у коров-носительниц аллеля I_2QO' ($4,18 \pm 0,086\%$), который превосходил таковой у не носителей данного аллеля на $0,42\%$ ($p < 0,001$). МДЖ коров-носителей аллеля QO' ($4,11 \pm 0,093$), также высокодостоверно ($p < 0,001$) превышала идентичный показатель у коров не имеющих этот аллель на $0,35\%$. Носители аллеля I_2Q также имели высокий уровень массовой доли жира в молоке ($4,1 \pm 0,121\%$) и высокодостоверно ($p < 0,001$) на $0,33\%$ превосходили своих сверстниц - не носителей.

У всех этих трех групп животных наблюдалось сочетание высокого уровня массовой доли жира с обильномолочностью ($3819 \dots 3844$ кг.) по сравнению с другими группами животных.

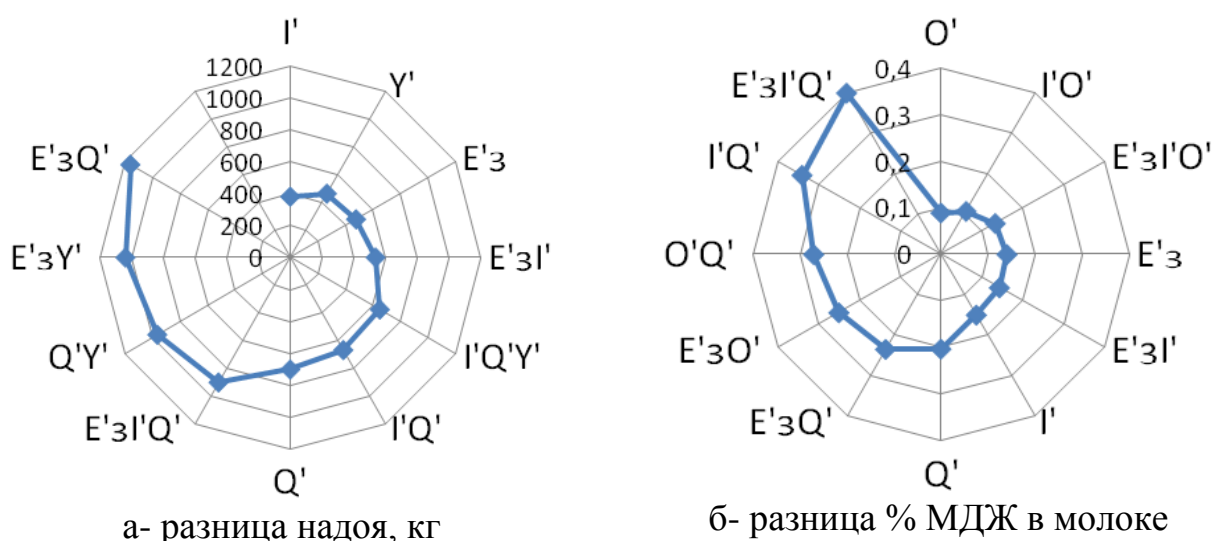


Рисунок 2 Влияние эритроцитарных антигенов на молочную продуктивность коров австрийской селекции

Животные австрийской селекции (Рис. 2а), имеющие аллели Q' , E'_3Q' , E'_3Y' , $Q'Y'$ и $E'_3I'Q'$, со средней продуктивностью 5309 ± 205 кг, 5825 ± 260 кг, 5751 ± 423 кг, 5655 ± 303 кг и 5631 ± 245 кг соответственно, превосходили по удою животных – не носителей этих аллелей на $700 \dots 1162$ кг ($p < 0,05 \dots 0,01$). Коровы, в генотипе которых наблюдались B_2I_2 и $B_2O'G''_2$, имели удои ниже в сравнении с животными – не носителями данных аллелей на 424 и 259 кг соответственно. Высокое содержание жира в молоке (Рис.2б) было отмечено у коров – носителей аллеля $I'Q'$, $O'Q'$ и $E'_3I'Q'$.

Таким образом, каждое стадо имеет свое специфическое распределение генных частот, генотипов, что является отражением особенностей селекционного процесса, методов содержания и разведения. В изученных стадах прослеживаются определенные аллели, которые могут быть генетическими маркерами молочной продуктивности коров. Эти аллели являются результатом длительного селекционного процесса, в связи с этим

целесообразно отбирать животных, несущих положительную генетическую информацию по В-аллелям групп крови, индивидуально для данной популяции. Так в стаде животных местной селекции НПО «Баймакское» обильномолочность коров обусловлена аллелями $Y_1A_1'Y'$, $Y_1A_1'A_2'Y'$ и $Y_1A_1'A_2'O'$, а высокая жирномолочность связана присутствием аллеля I_2QO' . Данные аллели могут быть использованы в селекционной работе в качестве генетических маркеров для раннего прогнозирования продуктивности животных. Среди коров австрийской селекции в данном хозяйстве желательны животные-носители аллелей Q' , $E_3'Q'$, $E_3'Y'$, $Q'Y'$ и $E_3'I'Q'$, и селекционный процесс необходимо направить на уменьшение численности животных с аллелями B_2I_2 и $B_2O'G''_2$.

Библиографический список

1. Литвинов, И.В., Анализ связи ЕАВ-системы групп крови с хозяйственно-биологическими признаками черно-пестрого скота [Текст] / И.В.Литвинов, С.Е. Тяпугин, Н.Ю. Катышева, О.Н. Бургомистрова // Зоотехния. - 2005. - №4. - С. 2-4.
2. Попов, Н.А. Методические рекомендации по формированию генетической структуры стада и совершенствованию племенных качеств скота с использованием систем групп крови [Текст] / Н.А. Попов, А.М. Якушенков. - Дубровицы, ВИЖ, 1997. – 48с.
3. Рябов, Ю.К. Связь морфологических и биохимических показателей крови животных с мясной продуктивностью [Текст] / Ю.К. Рябов, П.Е. Ерофеева // Уральские нивы. - 1978. - №11. - С. 51-53.

УДК 575.1:595

Сурков А.А., Гончаренко Г.Г., Митрофанов В.Г.

УО «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», Республика Беларусь, г. Гомель

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ИНДИКАТОРНЫХ ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Ключевые слова: *виды-двойники; Drosophila littoralis littoralis; D. lummei; протеомные маркёры; природные популяции.*

Введение

Генофонд индикаторных видов-двойников отражает характер генетической устойчивости природной экосистемы в целом [1]. Анализ генетической структуры и состояния популяционных генофондов индикаторных видов-двойников двукрылых семейства *Drosophilidae* Беларуси и сопредельных территорий практически не проводился.

Цель и задачи исследования

Целью нашей работы было изучение состояния генофондов двух индикаторных видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* из природных популяций приуроченных к речным и озёрным экосистемам Беларуси и сопредельных территорий, на основе анализа протеомных маркёров (изоферментов).

Материалы и методы исследования

В настоящее время на территории Беларуси и сопредельных стран в природных популяциях найдены два представителя *Drosophila* группы *virilis*: *D. littoralis littoralis* Meigen и *D. lummei* Hackman (рисунок 1). Они обитают вблизи незагрязненных водотоков и водоемов, буквально в литоральной зоне. За пределами пресных водоёмов эти виды отсутствуют.

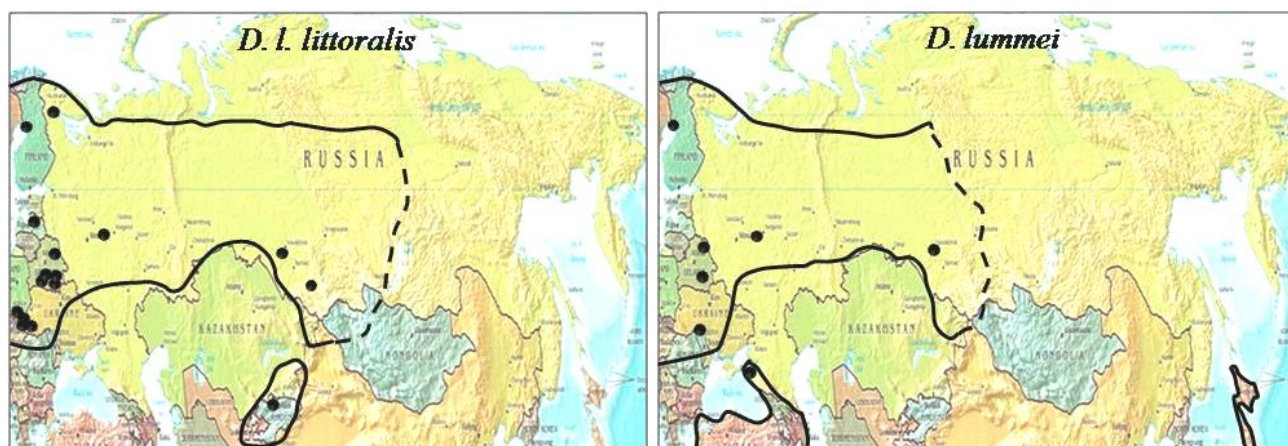


Рисунок 1 Места взятия выборок и распространение двух палеарктических видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* на территории Беларуси и сопредельных стран [6-9]

В ходе исследования взрослые особи двух видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* анализировались методом электрофореза. Каждая особь гомогенизировалась в 25 мкл дистиллированной воды или гелевого буфера. Электрофоретическое фракционирование гомогенизированных экстрактов индивидуальных особей проводилось нами по 11 ферментам в 13-14% крахмальном геле с использованием двух буферных систем: А) трис-ЭДТА-боратная, рН 8.6; В) трис-цитрат, рН 6.2. Все параметры электрофоретического фракционирования, а также экстракция и гистохимическое выявление ферментов подробно приведены нами ранее [2-4]. Каждая муха была исследована по 14 генам, кодирующим 11 ферментов. Обозначение выявленных электрофоретических вариантов дано по общепринятой номенклатуре Пракаша с соавторами [5], в соответствии с которой наиболее часто встречающийся электрофоретический вариант по каждому локусу и кодирующий его аллель обозначались символом 1.00, а все другие аллельные варианты, встреченные у проанализированных нами видов *Drosophila* группы

virilis обозначены цифровыми символами в зависимости от их электрофоретической подвижности относительно 1.00. Нулевые аллели обозначены символом 0.

Всего проанализировано 23 природные популяции, в которых нами было выявлено, по 11 ферментным системам, 42 различных электрофоретических варианта (электроморфа) у *D. l. littoralis* и 28 - у *D. lummei*.

Результаты исследования

В результате проведенного нами всестороннего генетического анализа двух представителей *Drosophila* группы *virilis* было установлено, что все 56 электроморфов находятся под генетическим контролем 14 локусов (протеомных маркеров). В проведенных исследованиях нами использованы протеомные маркеры только с установленной генетической детерминацией. Все выявленные аллельные варианты и их относительная электрофоретическая подвижность наглядно изображены на рисунке 2.

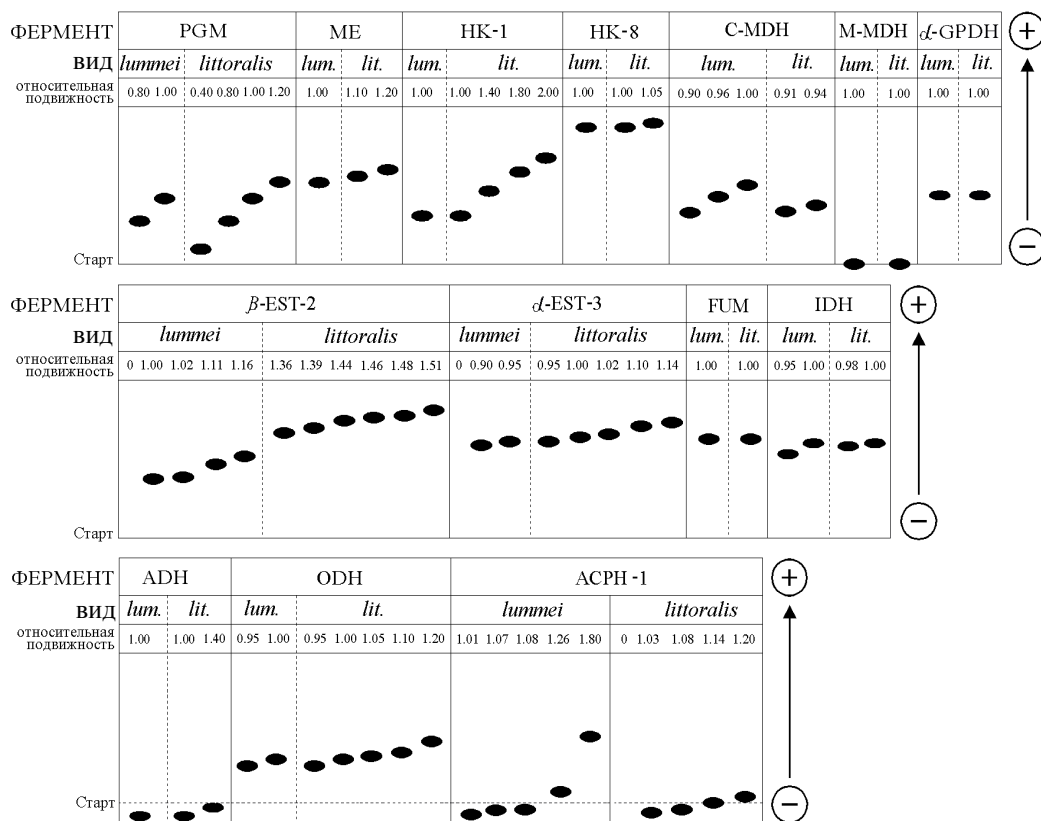


Рисунок 2 Схематическое изображение и обозначение электрофоретических спектров

Для оценки генетической структуры были рассчитаны частоты встречаемости аллелей в популяциях двух исследованных видов-двойников *Drosophila* группы *virilis*, которые наиболее точно отражают генетическую

структуру и являются эволюционно сложившейся характеристикой для каждой популяции.

В таблице 1 представлены аллельные частоты по 14 локусам у *D. l. littoralis* и *D. lummei* в природных популяциях Беларуси и сопредельных территорий (Россия, Украина и Балтия).

Таблица 1 - Аллельные частоты по 14 протеомным маркерам *D. l. littoralis* и *D. lummei*

Локус	Аллели	<i>D. l.littoralis</i>	<i>D. lummei</i>	Локус	Аллели	<i>D. l.littoralis</i>	<i>D. lummei</i>	
PGM	n ¹⁾	570	99	АСРН-1	n	603	98	
	0.40	.018	.000		0	.001	.000	
	0.80	.958	.929		1.01	.000	.020	
	1.00	.019	.071		1.03	.017	.000	
	1.20	.005	.000		1.07	.000	.051	
ME	n	605	98		1.08	.858	.643	
	1.00	.000	1.000		1.14	.071	.000	
	1.10	.002	.000		1.20	.053	.000	
	1.20	.998	.000		1.26	.000	.276	
HK-1	n	539	96		1.80	.000	.010	
	1.00	.011	1.000		ADH	n	535	96
	1.40	.978	.000		1.00	.002	1.000	
	1.80	.007	.000		1.40	.998	.000	
	2.00	.004	.000		α -GPDH	n	34	66
HK-8	n	539	96	1.00	1.000	1.000		
	1.00	.998	1.000	ODH	n	133	32	
	1.05	.002	.000	0.95	.015	.031		
β -EST-2	n	609	100	1.00	.917	.969		
	0	.000	.050	1.05	.023	.000		
	1.02	.000	.870	1.10	.038	.000		
	1.11	.000	.010	1.20	.007	.000		
	1.16	.000	.070	FUM	n	525	44	
	1.36	.002	.000	1.00	1.000	1.000		
	1.39	.002	.000	C-MDH	n	188	90	
	1.44	.074	.000	0.90	.000	.044		
	1.46	.021	.000	0.91	.952	.000		
	1.48	.575	.000	0.94	.048	.000		
	1.51	.326	.000	0.96	.000	.056		
α -EST-3	n	594	95	1.00	.000	.900		
	0	.000	.042	M-MDH	n	188	90	
	0.90	.002	.905	1.00	1.000	1.000		
	0.95	.178	.053	IDH	n	34	90	
	1.00	.052	.000	0.95	.000	.011		
	1.02	.332	.000	0.98	.912	.000		
	1.10	.296	.000	1.00	.088	.989		
	1.14	.140	.000					

Примечание: ¹⁾n - число проанализированных геномов

В ходе анализа особей двух видов оказалось, что локусы FUM, α -GPDH, M-MDH являются мономорфными, причём по этим генам у исследованных видов группы *virilis* найден только один аллель. Наибольшая изменчивость обнаружена по генам, кодирующим α -эстеразы-3, β -эстеразы-2, кислотную фосфотазу-1. В каждом из этих локусов встретилось более 7 аллелей.

На основании найденных частот встречаемости аллелей нами были вычислены параметры показателей, определяющих уровень изменчивости у представителей видов-двойников *Drosophila* группы *virilis*: *D. l. littoralis* и *D. lummei*. Значения основных показателей изменчивости приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Основные показатели изменчивости у двух исследованных видов-двойников *Drosophila* группы *virilis*

Название видов	Доля полиморфных локусов		Среднее число аллелей		Среднеожидаемая гетерозиготность (ошибка)
	95% критерий	99% критерий	с частотой > 0%	с частотой > 1%	
<i>D. l. littoralis</i>	0.357	0.571	3.000	2.286	0.149 (0.075)
<i>D. lummei</i>	0.357	0.500	2.000	1.857	0.094 (0.068)

Исходя из полученных данных, следует сказать, что в целом *D. l. littoralis* обладает существенным запасом генетической изменчивости, поскольку у нее около 60% локусов находится в полиморфном состоянии, количество аллелей на локус достигает 2.3, а каждая особь гетерозиготна в целом по 15% своих генов. Именно столь существенный запас генетической изменчивости, по-видимому, объясняет высокую экологическую пластичность данного вида, позволяя ему занимать огромный ареал Северной Евразии и иметь высокую численность особей в популяциях.

Исследование второго вида-двойника *D. lummei* показало, что здесь ситуация существенно отличается. Как видно из таблицы 2 только 50% локусов у данного вида находится в полиморфном состоянии, количество аллелей на локус не превышает 1.86, а каждая особь в среднем гетерозиготна лишь по 9.4% своих генов.

Относительно низкая гетерозиготность у вида-двойника – *D. lummei* сопровождается редкой численностью особей, большим количеством (до 50 %) неоплодотворённых самок.

В результате анализа частот встречаемости нулевых аллелей в природных популяциях 2 видов-двойников с использованием разработанной тест-системы [10] установлено, что у *D. lummei* наблюдается более высокая концентрация нулевых аллелей, чем у *D. l. littoralis*, указывающая на значительный сегрегационный груз и неблагоприятное состояние генофонда в популяциях *D. lummei*.

Нам не удалось обнаружить ни одной особи *D. lummei*, которая была бы гомозиготна по нулевым аллелям сразу в двух локусах. По-видимому, такое сочетание у *D. lummei* приводит к летальному исходу и отчасти может объяснять низкую плодовитость самок этого вида в природных популяциях.

Выводы

Таким образом, проведенный молекулярно-генетический анализ, по 14 протеомным маркерам у индикаторных видов-двойников *D. l. littoralis* и *D. lummei*, позволяет отслеживать изменения в генетической структуре, и тем самым формирует базу для эколого-генетического мониторинга, поскольку дает возможность улавливать все мутантные варианты появляющиеся в природных популяциях в результате загрязнения и при ухудшении экологической обстановки водной и околородной среды.

Работа выполнялась в рамках программы ГПОФИ «Радиация и антропоэкология», а так же договора о научном сотрудничестве между Учреждением образования «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины» и Учреждением РАН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова», г. Москва.

Библиографический список

1. Левонтин, Р. Генетические основы эволюции: Пер. с англ. / Р. Левонтин. - М.: Мир, 1978. – 352 с.
2. Гончаренко, Г.Г. Изучение биохимического полиморфизма у *Drosophila imeretensis* в природных популяциях Краснодарского края/ Г.Г. Гончаренко, В.Г. Митрофанов, А.Н. Катохин // Генетика. – 1984. – Т. XX. № 4. – С. 620-627.
3. Гончаренко, Г.Г. Аллозимная диагностика видов-двойников *Drosophila* группы *virilis*/ Г.Г. Гончаренко // ДАН СССР. – 1987. – Т. 295. № 4. – С. 976-980.
4. Сурков, А.А. Методический подход к исследованию генофондов короткоусых двукрылых *Drosophila* группы *virilis* в природных популяциях Беларуси / А.А. Сурков, Г.Г. Гончаренко, В.Г. Митрофанов, Л.И. Корочкин / Изв. Гомельского гос. ун-та им. Ф. Скорины.– 2003.– № 5 (20). – С. 50-54
5. Prakash, S. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* / S. Prakash, R.C. Lewontin, J.L. Hubby // Genetics, 1969. – V. 61. – P. 841–858.
6. Гончаренко, Г.Г. Электрофоретический ключ для типировки взрослых особей двойниковых видов *Drosophila* группы *virilis*, обитающих в Палеарктике / Г.Г. Гончаренко, И.М. Емельянов // Докл. АН СССР. – 1990. – Т. 313. № 2. – С. 448-452.
7. Goncharenko, G.G. An electrophoretic key to adult members of the sibling species belonging to the *Drosophila virilis* group (*Diptera, Drosophilidae*) inhabiting Soviet Union and adjacent countries / G.G. Goncharenko, I.M. Emelianov // Z. zool. Syst. Evolut.-forsch. – 1992. – V. 30. – P. 281-286.

8. Lakovaara, S. The use of isoenzymes in tracing evolution and in classifying *Drosophilidae* / S. Lakovaara, A. Saura, P. Lankinew, L. Pohjola, P. Lokki // Zool. Scr., 1976. V.5. – P.173-179.

9. Throckmorton L.H. The *virilis* species group In M. Ashburner and E. Novitsky [eds,]. The genetics and biology of *Drosophila* / L.H. Throckmorton. - London, Academic. – 1982. – V. 3B. – P. 227-297.

10. Сурков, А.А. Тест-система для выявления нулевых вариантов в генах, ответственных за синтез ключевых ферментов у видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* / А.А. Сурков, Г.Г. Гончаренко // Известия Гомельского гос. ун-та им. Ф. Скорины. – 2005. – №4. – С. 61-68.

УДК 636.082.12.002.6

Траспов А.А., Зиновьева Н.А., Долматова И.Ю.
ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, г. Уфа, Россия

ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ В ГРУППАХ КОРОВ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ

Микросателлиты, аллели, продуктивность, крупный рогатый скот, ПЦР, ДНК-маркеры

В настоящее время выявлено большое число микросателлитных маркеров (МС) у различных видов сельскохозяйственных животных. Все идентифицированные на сегодня МС domesticированных животных зарегистрированы в международном генном банке (GenBank или EMBL). Известно около 300 микросателлитных маркеров крупного рогатого скота. В соответствии с рекомендациями международного общества генетики животных (ISAG) в панель для проведения исследований на достоверность происхождения рекомендуется включение 9-и маркеров, которые получили название «международного набора» маркеров или панели ISAG: BM1824, BM2113, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, ETH10, ETH225.

Эти маркеры являются обязательными для использования с целью возможности сопоставления данных, получаемых в различных лабораториях. По мнению Кленовицкого П.М. [2], необходимо изучать связь генетических маркеров с количественными признаками. Это совершенно справедливо, потому что основная цель селекции – это увеличение продуктивности животных, т.е. в конечном итоге продуктов питания.

Материалом служили пробы ДНК, выделенные из ткани коров (ушной выщип и кровь) чёрно-пёстрой породы ГУСП «Агрофирма Стерлитамакская» РБ (СНР_AGRO). Выделение ДНК проводили с помощью колонок фирмы Nexttec (Германия) и с использованием набора реагентов для выделения ДНК DIAtomTM DNA Prep100 (ООО «Компания «Биоком», г. Москва) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Анализ ДНК и постановку ПЦР

проводили согласно «Методическим рекомендациям по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве» [1].

Определение микросателлитного профиля коров проводили с использованием ДНК-анализатора с лазерным детектором ABI3130x1 по методикам Центра биотехнологии и молекулярной диагностики ГНУ ВИЖ РАСХН. Набор маркеров для анализа включал следующие локусы: TGLA126, TGLA122, TGLA227, ILST005, ILST006, ETH185, ETH10, ETH225, BM1818, BM1824, BM2113, SPS115.

Частоты встречаемости аллелей рассчитывали отдельно для каждого локуса по формуле: $p_i = (2 * N_{ii} + N_{iy}) / (2 * N)$, где p_i – частота встречаемости i -го аллеля, N_{ii} – число животных, гомозиготных по i -му аллелю, N_{iy} – число животных, гетерозиготных по i -му аллелю (y – любой другой аллель), N – число голов в выборке.

В таблице 1 представлены частоты встречаемости аллелей МС в группах коров чёрно-пёстрой породы СНР_АГРО с «высоким» ($X_{cp} + 0,5\sigma$) по сравнению с «низким» ($X_{cp} - 0,5\sigma$) уровнем молочной продуктивности показал наличие ряда достоверных различий (*различия достоверны при $p < 0,05$*).

Таблица 1. Распределение частот аллелей МС в группах коров СНР_АГРО с различным уровнем молочной продуктивности по 1-й лактации

Показатель	Локус	Аллель	Распределение частот аллелей МС в группах			Разница III – I*
			I	II	III	
			$< X_{cp} - 0,5\sigma$	$X_{cp} \pm 0,5\sigma$	$> X_{cp} + 0,5\sigma$	
Удой, кг	TGLA122	149	0,063	0,044	0,150	0,088
	ETH10	217	0,274	0,047	0,367	0,092
	ETH225	152	0,016	0,068	0,083	0,068
	SPS115	248	0,625	0,122	0,383	-0,242
		256	0,109	0,079	0,267	0,157
Жир, %	TGLA126	123	0,100	0,023	0,067	-0,033
	TGLA122	141	0,267	0,105	0,067	-0,200
	BM1784	180	0,267	0,050	0,167	-0,100
Белок, %	ETH10	213	0,212	0,08	0,077	-0,135

Анализ данных по 1-й лактации показал наличие достоверной разницы в распределении 8 аллелей 6 локусов МС. По уровню удоя - аллели 149 локуса TGLA122 (+0,088, $p < 0,05$), 217 локуса ETH10 (+0,092, $p < 0,05$), 248 и 256 локуса SPS115 (-0,242, $p < 0,05$ и +0,068, $p < 0,05$, соответственно); по

содержанию жира в молоке - аллели 123 локуса TGLA126 (-0,033, $p < 0,05$), 141 локуса TGLA122 (-0,200, $p < 0,05$) и 180 локуса BM1874 (-0,100, $p < 0,05$); по содержанию белка в молоке - аллель 213 локуса ETH10 (+0,135, $p < 0,05$).

Таблица 2. Распределение частот аллелей МС в группах коров СНР_АGRO с различным уровнем молочной продуктивности по 2-й лактации

Показатель	Локус	Аллель	Распределение частот аллелей МС в группах			Разница III – I*
			I	II	III	
			$<X_{cp}-0,5\sigma$	$X_{cp}\pm 0,5\sigma$	$>X_{cp}+0,5\sigma$	
Удой, кг	ETH185	234	0,447	0,089	0,281	-0,166
		236	0,026	0,041	0,109	0,083
	TGLA122	141	0,289	0,059	0,172	-0,118
	ILST006	293	0,316	0,065	0,188	-0,128
	BM2113	133	0,111	0,059	0,000	-0,111
		137	0,222	0,059	0,306	0,084
Жир, %	ETH225	144	0,000	0,059	0,091	0,091
	BM1784	182	0,286	0,046	0,379	0,093
Белок, %	ILST005	181	0,810	0,134	0,640	-0,170
		183	0,190	0,134	0,360	0,170
	ETH185	222	0,095	0,036	0,022	-0,074
	ILST006	293	0,310	0,054	0,220	-0,090
	ETH10	217	0,262	0,049	0,360	0,098
	ETH225	144	0,095	0,017	0,060	-0,035
		150	0,262	0,036	0,320	0,058
	BM2113	137	0,500	0,139	0,271	-0,229
	SPS115	254	0,190	0,039	0,120	-0,070

По результатам анализа 2-й лактации (таблица 2) были выявлены 16 аллелей, в 10 локусах МС, частоты встречаемости которых достоверно различались между группами коров с «высоким» ($X_{cp}+0,5\sigma$) по сравнению с «низким» ($X_{cp}-0,5\sigma$) уровнем молочной продуктивности: по уровню удоя – аллели 234 и 236 локуса ETH185 (-0,166, $p < 0,05$ и +0,083, $p < 0,05$,

соответственно), 133 и 137 локуса BM2113 (-0,111, $p < 0,05$ и +0,084, $p < 0,05$, соответственно), 141 локуса TGLA122 (-0,118, $p < 0,05$), 293 локуса ILST006 (-0,128, $p < 0,05$); по содержанию жира в молоке – аллели 144 локуса ETH225 (+0,091, $p < 0,05$) и 182 локуса BM1784 (+0,093, $p < 0,05$); по содержанию белка в молоке – аллели 181 и 183 локуса ILST005 (-0,170, $p < 0,05$ и +0,170, $p < 0,05$), 217 локуса ETH10 (+0,098, $p < 0,05$), 144 и 150 локуса ETH225 (-0,035, $p < 0,05$ и +0,058, $p < 0,05$), 222 локуса ETH185 (-0,074, $p < 0,05$), 293 локуса ILST006 (-0,090, $p < 0,05$), 137 локуса BM2113 (-0,229, $p < 0,05$) и 256 локуса SPS115 (-0,070, $p < 0,05$).

Таким образом, анализ распределения частот встречаемости аллелей микросателлитов в исследованных группах коров с высокими ($X_{cp} + 0,5\sigma$) по сравнению с низкими ($X_{cp} - 0,5\sigma$) уровнями молочной продуктивности показал наличие ряда достоверных различий как по первой, так и по второй лактации. Для коров чёрно-пёстрой породы СНР_АГРО различия отмечены в распределении по 1-й лактации 8 аллелей 6 локусов МС и 16 аллелей в 10 локусах МС во второй.

Во всех исследованных локусах МС установлены аллели, наличие которых в генотипе достоверно коррелировало с показателями молочной продуктивности коров изучаемых башкирских популяций черно-пестрого скота, при этом показан породо- и популяционно-зависимый характер выявленных зависимостей.

Библиографический список

1. Зиновьева Н.А., Попов А.П., Эрнст Л.К., Марзанов Н.С., Бочкарев В.В., Стрекозов Н.И., Брем Г. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. Дубровицы: ВИЖ, 1998. 47 с.
2. Кленовицкий П.М. Генетика и биотехнология в селекции животных / П.М. Кленовицкий, Н.С. Марзанов, В.А. Багиров, М.Г. Насибов. – М.: ФГУП «Эксплор», 2004. – 285 с.

УДК 636.22 / 28.12

Юмагузин И.Ф.

ГНУ Башкирский НИИ сельского хозяйства РАСХН, г. Уфа

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА К-CAS У ЖИВОТНЫХ РАЗНОЙ СЕЛЕКЦИИ

Ключевые есть: каппа-казеин; генетический контроль; селекция.

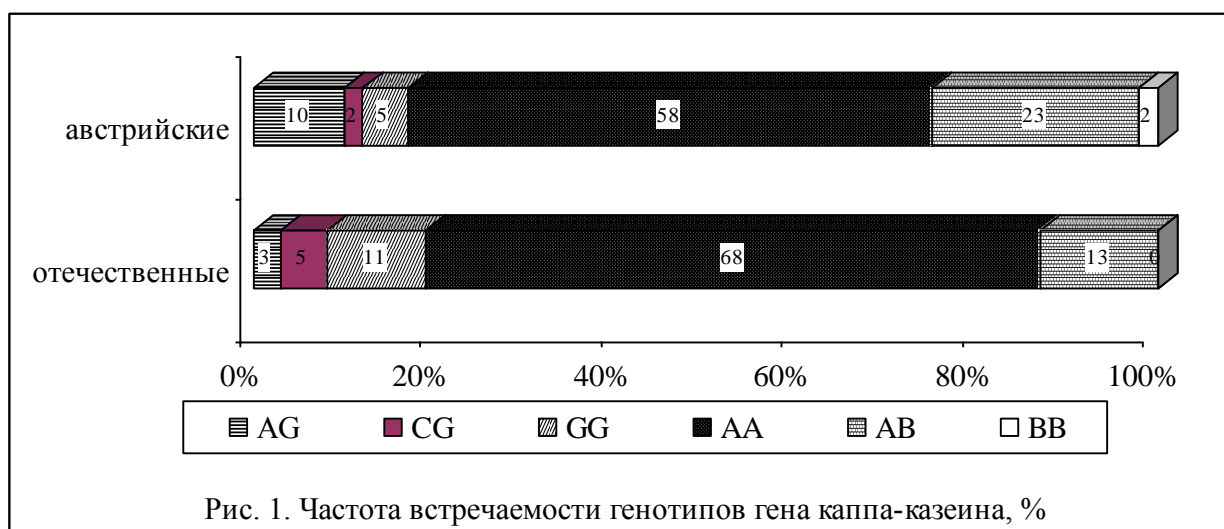
В молоке различают ряд белков, из которых основными являются казеин и сывороточные белки (альбумин и глобулин). Анализы, выполненные в разное время зарубежными и отечественными учеными, показали, что независимо от породной принадлежности животных, объем и качество сыров и творога в

значительной степени определяются одной из фракций казеина – каппа-казеином, структура которого контролируется одним полиморфным геном. На сегодняшний день выявлено 10 его аллелей - А, В, С, Е, F, G, H, I, X, A1 [3, 5].

В фенотипе у гетерозиготы проявляются оба аллеля, т.е. наблюдается кодоминантный тип наследования признака. Наиболее распространенными в породах являются аллели А и В. В исследованиях отмечается лучшие технологические свойства молока (консистенция казеинового сгустка, время сычужного свертывания) от коров с генотипом ВВ, меньшие его затраты на производство сыра и творога, а также более высокое качество этих продуктов. Выход готовой продукции по коровам с генотипом ВВ - на 8-10% больше, чем с генотипом АА. Животные с генотипом АВ имеют промежуточные показатели [1].

В ходе исследований установлено, что частота встречаемости желательных генотипов по каппа-казеину существенно варьирует по породам и странам. Так, при использовании голштинской породы и швицкой американской селекции, в качестве улучшающих на популяциях молочного скота России, наблюдается значительное снижение доли генотипов с аллелем В [2, 4].

Материал и методика исследований. С целью установления генетических различий нами были выполнены популяционно-генетические исследования полиморфизма некоторых генов белков молока у симментальских коров отечественной (n=50 гол) и австрийской селекции (n=57 гол) из стада племязавода ОПХ «Баймакское» Республики Башкортостан. Для этого у животных отбирали пробы ткани (ушной выщип). ДНК выделяли в лаборатории ВИЖа по стандартной методике (Зиновьева и др., 2002). Определение полиморфизма генов белков молока: каппа-казеина, бета-казеина и альфа-лактальбумина проводили методом ПЦР-ПДРФ анализа (Гладырь и др., 2001; Костюнина и др., 2003). Частоту встречаемости генотипов и аллелей определяли по общепринятым формулам.



Результаты исследований. Частоты встречаемости генотипов каппа-казеина в исследуемых группах представлены на рисунке 1. В группе отечественных коров наблюдается меньшая частота генотипа АВ, а генотипа ВВ, желательного с точки зрения сыроделия, вообще не было идентифицировано.

Определенный интерес представляют также альфа-лактоальбумины и бета-казеины. Первые относятся к легко усвояемым белкам, а последние ускоряют процесс приготовления сыров, сокращая время сворачивания молока и выделения из него большого количества сыворотки.

Распределение генотипов альфа-лактоальбумина и бета-казеина приведено на рисунке 2.

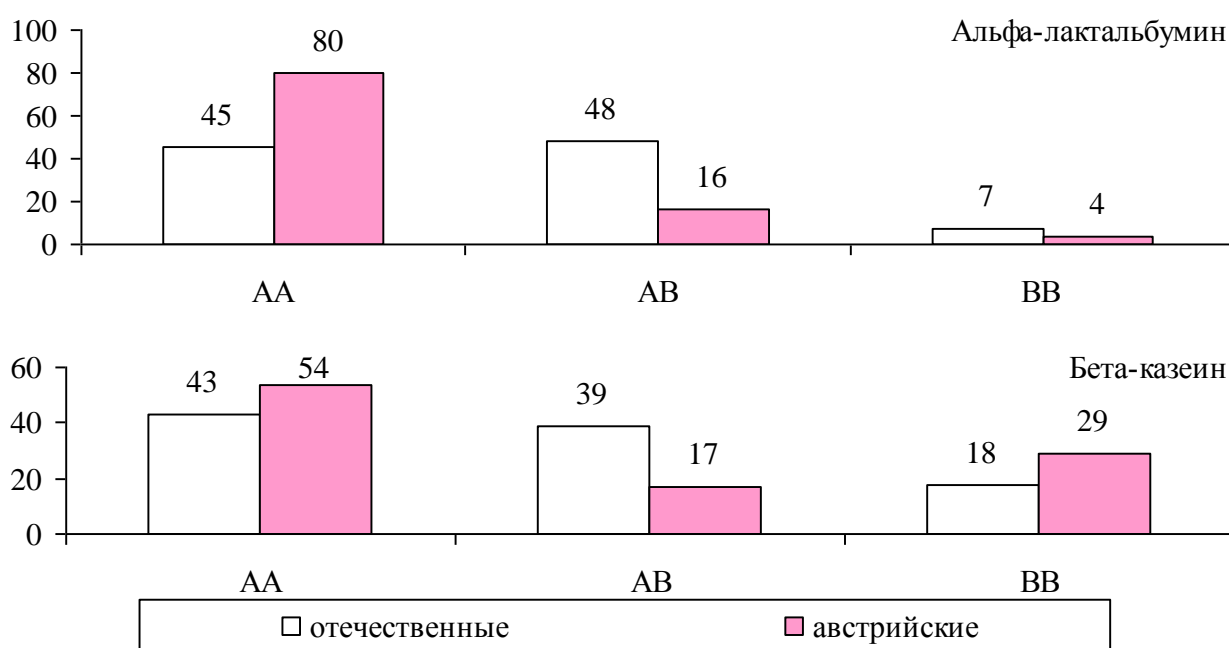


Рис. 2. Частота встречаемости генотипов генов альфа-лактоальбумина и бета-казеина, %

Как видно из рисунка 2, между исследуемыми группами животных отмечаются некоторые различия в частотах встречаемости генотипов генов альфа-лактоальбумина и бета-казеина. У австрийских коров наблюдается большая частота генотипов AA по генам альфа-лактоальбумина и бета-казеина.

Данные о распределении частот встречаемости аллелей исследуемых генов приведены в таблице 1.

Из таблицы видно, что в обеих группах животных из 10 известных аллелей гена каппа-казеина было выявлено всего 4. При этом следует отметить, что у австрийских коров частота встречаемости желательного аллеля В гена каппа-казеина в два с лишним раза выше, чем у отечественных. Что касается частоты желательного аллеля А бета-казеина, повышающего термоустойчивость молока, то заметных различий между исследуемыми группами выявлено не было.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют, что в Республике Башкортостан на сегодняшний день имеется возможность комплектования племпредприятий ремонтными бычками с желательным генотипом по белку каппа-казеин.

Таблица 1. Частота аллелей генов каппа-казеина, альфа-лактоальбумина и бета-казеина

Ген / группа коров	Частота аллелей			
	А	В	С	G
Каппа-казеин				
Отечественная	0,763	0,066	0,026	0,145
Австрийская	0,744	0,140	0,012	0,104
Альфа-лактоальбумин	А		В	
Отечественная	0,690		0,310	
Австрийская	0,880		0,120	
Бета-казеин	А		В	
Отечественная	0,628		0,372	
Австрийская	0,625		0,375	

Библиографический список

1. Афанасьев М.П. Генетическая структура, белковый состав и технологические свойства молока холмогорской, венгерской голштино-фризской пород скота и их помесей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 1996. – 24 с.

2. Дунин И.М., Харитонов С.Н., Ермилов А.Н., Сперанский А.Т., Кондрашев А.А. Бурый скот России. – М.: ВНИИплем, 1998. – 101 с.

3. Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А., Фролкин Д.А. и др. Применение ДНК-диагностики для анализа генов-кандидатов локусов количественных признаков сельскохозяйственных животных // Животноводство XXI век / Науч. тр. ВИЖа – вып. 61. – Дубровицы, 2001. – С. 218-224.

4. Калашникова Л.А., Дунин И.М., Глазко В.И., Рыжова Н.В., Голубина Е.П. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных. – Лесные Поляны: ВНИИплем, 1999. – 148 с.

5. Немцов А.А., Зиновьева Н.А., Юмагузин И.Ф., Горяминский В.П., Гарипова Н.Ш. Полиморфизм гена каппа-казеина симментальских животных отечественной и австрийской селекции // Достижения науки и техники АПК – 2007. - №2. – С. 31-33.

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ГЕНЕТИКЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 619:616

Андреева А.В., Николаева О.Н.

ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ

МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ МИКРОФЛОРЫ ЭНТЕРОБИОЦЕНОЗА МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Ключевые слова: есть: антибиотикоустойчивость микрофлоры; резистентность; сельскохозяйственные животные

Для лечения желудочно-кишечных болезней молодняка сельскохозяйственных животных предложено большое количество схем с использованием антибиотиков, сульфаниламидных, нитрофурановых и препаратов других лекарственных групп. Применение антибиотиков и сульфамидных препаратов позволяет добиваться выздоровления заболевших телят и поросят. Однако, систематическое применение антибиотиков привело в последние годы к распространению антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, нарушению механизмов защиты и развитию иммунодепрессивных состояний организма животных [3,4,5].

Использование традиционных схем лечения желудочно-кишечных заболеваний с применением антибиотиков не всегда может привести к положительному результату. К тому же основным недостатком этих средств является отсутствие избирательного действия (то есть они подавляют рост или действуют губительно на все микроорганизмы в кишечнике, в том числе и на представителей резидентной (автохтонной) микрофлоры), кроме этого они оказывают угнетающее действие на иммунную систему [1,2].

Профилактика желудочно-кишечных болезней приобретает социальную значимость, поскольку параллельно с увеличением потребления животноводческой и свиноводческой продукции возрастает риск её контаминации сальмонеллами, эшерихиями, иерсиниями и другими микроорганизмами - возбудителями пищевых токсикоинфекций у человека.

В связи с этим, целью нашего исследования явился анализ антибиотикоустойчивости микрофлоры энтеробиоценоза молодняка сельскохозяйственных животных.

Объектом исследования служили новорожденные телята и поросята в возрасте от рождения до 15 дней.

Чувствительность культур выделенной условно-патогенной микрофлоры к антибиотикам определяли методом диффузии в агар с использованием

бумажных дисков (Меньшиков В.В.,1987). Для определения чувствительности бактерий к антибиотикам, в чашки Петри разливали по 20 мл расплавленного мясо-пептонного агара и после застывания среды и подсушивания на поверхность наслаивали испытуемые культуры. Взвесь бактерий равномерно распределяли при помощи шпателя по всей поверхности среды в чашке. Затем на нее стерильным пинцетом накладывали бумажные диски, пропитанные различными антибиотиками. В каждую чашку вносили по 9 дисков, размещая их примерно на равном расстоянии друг от друга, после чего чашки оставляли на 3 часа при комнатной температуре для преддиффузии антибиотика.

После выдерживания в термостате при температуре 37°C, чашки Петри помешали агаром вверх в течение 16-24 часов и учитывали результаты.

Степень чувствительности культур к препаратам определяли по зоне задержки роста микроорганизмов. При задержки зоны роста микрофлоры энтеробиоценоза телят и поросят в диаметре 10 мм и менее микробы относили к устойчивым, 11-15 мм – к умеренно чувствительным, 16-25 – к чувствительным, более 25 мм – к высокочувствительным.

Проверяли чувствительность смешанной микрофлоры, которая была представлена стрептококками, стафилококками, кишечной палочкой, протеем, псевдомонадами и грибами рода *Candida*.

Из 14 испытанных препаратов всего три (21,4%) средства были высокоактивны по отношению к условно-патогенной микрофлоре желудочно-кишечного тракта, выделенных от поросят (цефалексин, цефазолин, рифампицин), от телят, соответственно, - четыре (28,5%) средства (цефалексин, цефазолин, рифампицин, гентамицин), что свидетельствует об устойчивости, выделенных штаммов бактерий к ним.

Мало чувствительна микрофлора желудочно-кишечного тракта телят и поросят к тетрациклину, стрептомицину, неомицину. Не эффективными препаратами в отношении полевых штаммов оказались как у телят, так и поросят бензилпенициллин, ампициллин, олеандомицин, эритромицин – 100% у обоих видов животных.

Исследование антибиотикочувствительности у штаммов условно-патогенных бактерий энтеробиоценоза телят и поросят показало, что среди них имеется большое количество резистентных вариантов.

Проведенные исследования показали, что число резистентных и полирезистентных штаммов условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из желудочно-кишечного тракта телят и поросят, продолжает увеличиваться.

Все вышеизложенное создает определенные трудности при проведении лечебных мероприятий при желудочно-кишечных заболеваниях, вызванных условно-патогенной микрофлорой. Целесообразно на животноводческих комплексах перед применением антибиотиков проводить определение резистентности микрофлоры к ним.

В связи с этим, разработка методов профилактики желудочно-кишечных болезней молодняка с использованием экологически безопасных препаратов, направленных на восстановление кишечного биоценоза путем регуляторного введения живых бактерий – представителей нормальной кишечной микрофлоры животных (пробиотиков и синбиотиков), является наиболее перспективной.

Библиографический список

1. Видовое разнообразие и антибиотикочувствительность грамотрицательных бактерий, изолированных в птицеводческом хозяйстве / Кузнецова М. В. и [др.] // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: биология, клиническая медицина. – 2010. - №8. – С. 70-77.
2. Ильинский Е. В., К. Г. Габриелян. Острые расстройства пищеварения у новорожденных телят // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2006. - №1. – С. 67-68.
3. Ковальчук Н.М., В.В. Ключевский, А.А. Лёзова. Современные представления этиопатогенеза ассоциированных желудочно-кишечных инфекций телят. // Аграрная наука на рубеже веков: мат.-лы региональной научн.-практ. конф. КрасГАУ, Красноярск, 2006. - С. 117-119.
4. Меры борьбы с диареями новорожденных телят / В.А. Мищенко [и др.]. // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2008. – №3. – С. 18-20.
5. Ivanov I., Eneva D. Antibioresistance of bacteria - increasing challenge // Trakia Journal of Sciencesю. - 2008. - Vol.6. - P. 30-35.

УДК 582.998.1

Денисова С.Г., Пупыкина К.А., Миронова Л.Н., Реут А.А.

ФГБУ Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН, г. Уфа
ФГБОУ ВПО БГМУ, г. Уфа

РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОРНЕКЛУБНЕЙ ГЕОРГИН В БОТАНИЧЕСКОМ САДУ ГОРОДА УФЫ

Ключевые есть: георгины; фруктозосодержащие углеводы; биологически активные вещества

В последние годы возрос интерес к проблеме интродукции растений, содержащих ценные биологически активные вещества (эфирные масла, полисахариды, аминокислоты, витамины и др.) необходимые организму человека. В связи с этим возникла потребность в изучении химического состава корнеклубней георгин, как перспективных источников инулинсодержащего сырья. Клубни георгин перерабатывают как перспективное сырье в США, странах Европы для получения инулина, обладающего широким спектром

фармакологического действия [1]. Однако химический состав подземных органов георгин изучен недостаточно.

Материалы и методы исследования

Объектами фитохимического исследования служили образцы корнеклубней георгин, выращенных на территории Ботанического сада г. Уфы и высушенных до воздушно-сухого состояния. Это вид *Dahlia merckii* Lehm. и 6 сортов (Колор Спектакль, Канзас, Винни Пух, Зной, Лебедушка, Черемушки). В качестве сравнения использовался основной источник получения инулина в России - клубни топинамбура (*Helianthus tuberosum* L.).

Макроскопический и микроскопический анализ сырья проводили по методикам Государственной фармакопеи [2]. Для исследования применяли микроскоп Мини-Мед 501 с увеличением 4x0,10x37,5; 10x0,25x7,63; 40x0,65x0,63; а также фотосъемку с использованием фотонасадки и цифрового фотоаппарата Canon PC 1106. Полученное изображение редактировали в программе Microsoft Photo Editor.

Определение качественных и количественных характеристик различных сортов георгины проводилось в аналитических пробах сырья, высушенного до воздушно-сухого состояния по методикам Государственной Фармакопеи XI издания и др. Для всех образцов определяли показатель влажности сырья, который учитывали при расчетах количественного содержания биологически активных веществ. Определение содержания эфирного масла в исследуемых образцах георгин проводили путем его перегонки с водяным паром из растительного сырья по методу I [2]. Определение содержания аскорбиновой кислоты проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 730 нм, основанным на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать натрия фосфорномолибдат и изменять при этом окраску раствора [3]. Содержание свободных органических кислот определяли алкалометрическим методом прямого титрования, основанным на нейтрализации органических кислот раствором гидроксида натрия в пересчете на яблочную кислоту [2]. Количественное определение дубильных веществ в исследуемых образцах устанавливали методом окислительно-восстановительного титрования [2]. Содержание высокомолекулярных фруктозанов (ВМФ) в пересчете на инулин, низкомолекулярных фруктозанов (НМФ – инулоидов) по отдельности, а также количество суммарных фруктозанов проводили спектрофотометрическим методом по реакции взаимодействия фруктозанов с резорцином в кислой среде [4].

Результаты и их обсуждение

В Ботаническом саду-институте Уфимского научного центра РАН проводится большая работа по интродукции растений разных таксонов, экологических групп, жизненных форм. Из них определенный интерес представляют растения, содержащие ценные биологически активные вещества и являющиеся перспективными источниками их получения. В этом плане, актуально изучение представителей семейства *Asteraceae*, а именно растений рода георгина (*Dahlia* Cav.), как основных источников накопления фруктозосодержащих углеводов.

Макроскопический анализ аналитической пробы сырья проводили визуально и с помощью лупы (10х), обращая внимание на структуру корнеклубней георгин, цвет, запах и вкус водного извлечения. В результате были выделены следующие характерные внешние признаки: цельные или разрезанные куски (длиной до 70-100 мм и диаметром до 35 мм) клубневидноутолщенных корней с остатками отмерших надземных побегов. Поверхность корневищ светло-коричневого цвета, на изломе - серовато-белого цвета. От корнеклубней отходят немногочисленные, довольно крупные и длинные корни. Поверхность корней продольно-морщинистая желтовато-бурого цвета, в изломе корни серовато-белые.

Биологически активные вещества в изучаемых образцах георгин представлены веществами разнообразной химической природы. В результате качественных реакций и хроматографического анализа в образцах сырья георгин обнаружены: полисахариды, дубильные вещества, аминокислоты, аскорбиновая кислота.

Поскольку в исследуемых образцах одновременно присутствуют фруктоза, инулин (высокомолекулярные фруктозаны) и инулоиды (низкомолекулярные фруктозаны), необходимо было определить количественно каждую группу в отдельности (рис. 1).

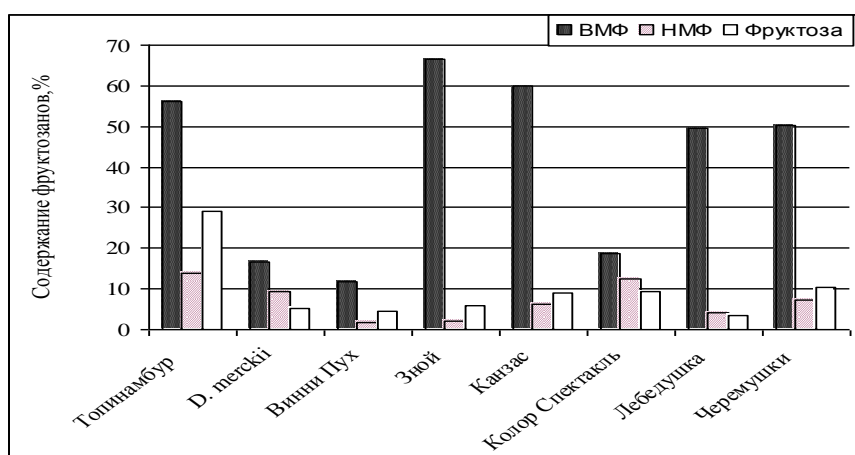


Рис. 1. Содержание фруктозанов в исследуемых образцах.

Анализируя полученные данные, можно отметить, что максимальное накопление высокомолекулярных фруктозанов (инулина) отмечается в сортах Зной (66%) и Канзас (60%), в топинамбуре его содержание было в 1,2 раза меньше. В сортах Колор Спектакль, Винни Пух и *D. merckii* количество инулина было в 3,0-4,7 меньше, чем в топинамбуре. По содержанию низкомолекулярных фруктозанов и фруктозы лидирующее положение занимает топинамбур.

Результаты определения содержания некоторых групп биологически активных веществ (эфирных масел, дубильных веществ, органических кислот и аскорбиновой кислоты) представлены в таблице 1.

При анализе данных таблицы 1 установлено, что высоким содержанием эфирных масел отличаются корнеклубни сортов Канзас и Черемушки (1,151 и

1,143%). Это согласуется с данными микроскопического исследования, так как в этих же сортах было отмечено наибольшее количество эфиромасличныхместилиц и клеток-идиобластов, а в объекте сравнения (клубнях топинамбура) - только следы эфирного масла.

При количественном определении дубильных веществ было выявлено, что максимальным содержанием данной группы веществ характеризуются корнеклубни вида *D. merckii* и сорта Канзас.

При определении содержания органических кислот в исследуемом растительном сырье отмечали более высокое их накопление в топинамбуре, по сравнению с сортовыми георгинами.

Таблица 1

Показатели содержания БАВ в исследуемых объектах

Исследуемый объект	Числовые показатели, ($x \pm E_{\alpha}$)			
	эфирных масел, %	дубильных веществ, %	органических кислот, %	аскорбиновой кислоты, мг%
Топинамбур	-	0,918 \pm 0,031	0,463 \pm 0,020	1,89 \pm 0,04
<i>Dahlia merckii</i>	0,221 \pm 0,005	1,173 \pm 0,036	0,208 \pm 0,009	2,10 \pm 0,05
Винни Пух	0,471 \pm 0,014	0,849 \pm 0,025	0,205 \pm 0,004	2,34 \pm 0,08
Зной	0,639 \pm 0,019	0,897 \pm 0,027	0,197 \pm 0,004	2,28 \pm 0,06
Канзас	1,151 \pm 0,035	1,072 \pm 0,044	0,211 \pm 0,010	2,16 \pm 0,07
Колор Спект.	0,580 \pm 0,026	0,944 \pm 0,028	0,209 \pm 0,010	2,40 \pm 0,08
Лебедушка	0,118 \pm 0,02	0,868 \pm 0,017	0,213 \pm 0,006	2,00 \pm 0,04
Черемушки	1,143 \pm 0,032	0,833 \pm 0,022	0,190 \pm 0,008	2,42 \pm 0,08

Результаты определения содержания аскорбиновой кислоты во всех исследуемых объектах показали, что у сортов георгин содержание витамина С в 1,3 и 1,2 раза больше, чем у *D. merckii* и топинамбура.

Выводы

1. Методами фармакогностического анализа определены показатели подлинности и доброкачественности дикорастущего и сортовых видов корнеклубней георгин.

2. Изучен качественный состав корнеклубней георгин и установлено присутствие фруктозосодержащих углеводов, дубильных веществ, эфирного масла, аскорбиновой и суммы органических кислоты.

3. Установлено количественное содержание основных групп биологически активных веществ. Установлено, что максимальное накопление наиболее важной группы фруктозанов отмечено в сортах Зной и Канзас. По содержанию низкомолекулярных фруктозанов и фруктозы лидирующее положение занимает топинамбур.

Библиографический список

1. Nilsson U., BjOrck I., Availability of cereal fructans and inulin in the rat intestinal tract // Carbohydrate and Fiber. - New York, 1988. - P. 1482-1486.
2. Государственная фармакопея СССР: Вып.1 и 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – XI – е изд. - М.: Медицина, 1987,1989. – 336 с.,400 с.
3. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. – Изд. 2-е, доп. и перераб. М.: «Колос», 1976. 256 с.
4. Беляков К.В. Методологические подходы к определению биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье спектрофотометрическим методом. – М., 2004. – 188 с.

УДК 633.111:632.4

Ибрагимов Р.И., Шпирная И.А., Цветков В.О., Яруллина Л.Г.,
Валиахметова К.И.
ФГБОУ Башкирский ГУ, г. Уфа, Россия

АКТИВНОСТЬ ПЕКТИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ЛИСТЬЯХ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ В СВЯЗИ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ СОРТОВ К *SEPTORIA NODORUM BERK*

Ключевые слова: септориоз; пшеница; устойчивость; пектолитические ферменты; белок; ингибитор пектиназы

Септориоз является одним из наиболее широко распространенных и вредоносных заболеваний зерновых культур. Возбудителями септориоза являются грибы из рода *Septoria* (*S. nodorum*, *S. graminum*, *S. tritici*, *S. hordei*, *S. secalis* и др.). Наибольшей вредоносностью, приводящей к большим потерям урожайности пшеницы, характеризуется *S. nodorum Berk. et Br.* (класс *Deuteromycetes*, порядок *Sphaeropsidales*). Основными методами борьбы с данным заболеванием являются создание и использование устойчивых сортов, разработка новых эффективных, экологически безопасных средств защиты растений. Успешное решение этих проблем сдерживается рядом причин, одной из которых является слабая изученность природы и биохимических механизмов проявления патогенности возбудителями заболевания. Как известно, неодинаковая устойчивость к патогенным микроорганизмам, обуславливается, прежде всего, генетическими особенностями сортов, следствием которой является различия в качественном и количественном составе экспрессируемых белков прямо или опосредованно участвующих в защитных реакциях растительного организма. Из литературы известно, что детерминантами патогенности ряда бактерий и грибов могут служить ферменты, токсины [1,2], ингибиторы ферментов [3] и другие биологически активные белки. Так, одним из факторов агрессивности и патогенности микроорганизмов, насекомых–фитофагов являются гидролитические ферменты [4-7]. Работы последних лет

свидетельствуют, что важной составляющей защитного ответа растений является образование ими белков - ингибиторов гидролаз [7,8]. Экспериментальные работы, направленные на исследование гидролаз как возможных биохимических факторов патогенности микроорганизмов и их природных ингибиторов как биохимических компонентов защитных реакций пока в литературе немногочисленны [9,10]. Между тем, комплексное изучение физиолого-биохимической природы патогенности микроорганизма и защитных механизмов растения является актуальным как в общебиологическом, так и в практическом отношении: в качестве теоретической основы для целенаправленной разработки новых средств защиты растений и создания устойчивых к патогенам сортов. Более того, относительный уровень активности гидролитических ферментов и их ингибиторов при инфицировании, может служить дополнительным диагностическим признаком при анализе степени устойчивости сортов растений к патогену.

Целью данной работы было выявление различий в уровнях активности пектиназ и их ингибиторов в листьях некоторых сортов пшеницы при заражении их *S. nodorum* Berk.

Методика

Объектом исследования служили листья яровой пшеницы сортов: Башкирская 26, Симбирка, Казахстанская 10, Омская 35, Омская 36.

Для получения инфицированных проростков, предварительно стерилизованные семена пшеницы, проращивали в чашках Петри, в среду прорастания вносили суспензию спор гриба *S. nodorum* Berk в концентрации 10^6 спор/мл. В качестве контроля использовали проростки, выращенные без заражения.

Для получения инфицированных листьев семена пшеницы проращивали на фильтровальной бумаге при комнатной температуре. Полностью развернутые листья 7-ми суточных проростков срезали, помещали во влажную камеру на фильтровальную бумагу, срезы прикрывали ватой, смоченной в растворе бензимидазола (40 мг/л). Отрезки листьев инокулировали суспензией пикноспор *S. nodorum* Berk. (10^6 спор/мл).

Инокулированные листья выдерживали при комнатной температуре в темноте в течение 24 ч, после чего переносили на искусственное освещение с фотопериодом 16 ч/сут.

Интенсивность развития гриба на эпидермисе листьев оценивали через 120 ч, активность пектиназ и ингибиторов экзогенной пектиназы определяли через 48 часов после инокуляции. В качестве контроля использовали неинфицированные листья растений. Определение активности растительных пектиназ и ингибиторов коммерческого препарата пектиназы *Aspergillus niger* (Sigma, США) осуществляли по гидролизу яблочного пектина в агарозном геле [11]. Определения концентрации водорастворимого белка в растворах проводили по методу Бредфорд. Калибровочную кривую для определения концентрации белка строили по α -химотрипсину.

Эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. В качестве величины погрешности использовали доверительный интервал выборочного среднего.

Результаты и обсуждение

Проростки пшеницы Саратовская 55, полученные из инфицированных семян существенно отличались по уровню активности пектолитических ферментов и ингибиторов пектиназы *A.niger* от контрольного варианта. Как видно (табл.1), зараженные проростки характеризуются более высокой активностью пектиназ и пониженной активностью ингибиторов, при сравнении с неинфицированными образцами (около 2-х раз). По-видимому, такое характерное для заражения патогеном изменение уровня активности ферментов и ингибиторов происходит вследствие интенсивного развития патогена в растительных тканях. Известно, что культура гриба *S. nodorum Berk*, обладает активным комплексом пектолитических и целлюлолитических (в т.ч. и экстрацеллюлярных) ферментов [12]. Вероятно определенная часть пектиназной активности в экстрактах инфицированных проростков принадлежит ферментам гриба *S. nodorum*.

Таблица 1

Активность пектиназ и их ингибиторов в проростках пшеницы (Саратовская 55), зараженных септорией

Вариант опыта	Активность пектиназ, Е/мг белка	Активность ингибиторов пектиназы <i>A.niger</i> , ИЕ/мг белка
Контроль	9,75 ± 0,73	6,69 ± 0,52
Заражение	20,65 ± 2,12	3,58 ± 0,39

Снижение уровня антипротеолитической активности в зараженных проростках можно объяснить затратой определенной доли ингибиторов на подавление гидролитической активности путем образования с молекулами ферментов функционально неактивных комплексов.

Для более детального исследования изменений в уровне активности пектиназ и их ингибиторов нами были осуществлены эксперименты с использованием изолированных листьев нескольких сортов пшеницы.

Как видно из табл. 2, в отсутствие заражения исследуемые сорта незначительно различались по уровню пектолитической активности в листьях. Максимально высокое значение этого показателя у сорта Омская 35 лишь в 1,2 раза превышало минимальный уровень (сорт Симбирка). Заражение листьев патогеном сопровождалось изменением уровня активности пектиназ: соотношение между максимальным уровнем (Башкирская 26) и минимальным (Омской 36) через 48 час после инокуляции составляло уже 1,6.

Таблица 2

Активность пектолитических ферментов и ингибиторов пектиназы *A. niger* в листьях яровой пшеницы различных сортов при инфицировании *S. nodorum* Berk.

Сорт пшеницы	Пектиназа, мЕ/г массы		Ингибиторы пектиназы <i>A. niger</i> , мИЕ/г массы	
	Контроль	Инфицирование	Контроль	Инфицирование
Башкирская 26	25,95±3,1	30,66±1,8	22,12±1,2	22,12±1,6
Симбирка	21,64±0,8	28,26±1,5	26,68±2,9	25,26±0,8
Казахстанская 10	23,75±2,3	23,75±2,1	22,12±0,6	18,59±0,8
Омская 35	21,64±0,7	15,90±0,9	22,12±2,5	25,26±2,1
Омская 36	23,75±1,4	19,63±1,5	20,40±1,4	22,12±0,2

Как видно, в неинфицированных листьях различных сортов мягкой пшеницы уровень активности пектолитических ферментов варьирует незначительно, однако при инфицировании данная активность повышается в листьях сорта Башкирская 26 и Симбирка; не изменяется в листьях пшеницы Казахстанская 10 и значительно снижается в листьях пшеницы сортов Омская 35 и Омская 36.

Активность соединений, ингибирующих пектиназу *A. niger* в листьях неинфицированных растений, различается до двух раз (15,90-30,66 мИЕ/г), причем при заражении септориозом, активность ингибиторов снижается у сортов Симбирка и Казахстанская 10; не изменяется в листьях пшеницы сорта Башкирская 26 и повышается в листьях сортов Омская 35 и Омская 36. Таким образом, при инфицировании листьев пшеницы Омская 35 и Омская 36 уровень активности ингибиторов экзогенной микробной пектиназы повышается при сравнении с остальными сортами, что, вероятно, является одним из способов борьбы с грибной инфекцией. Интересно отметить, что, несмотря на инфицирование в листьях не происходит повышения пектолитической активности, напротив она значительно снижена при сравнении с контрольным вариантом. Это также может способствовать угнетению развития патогена в тканях, поскольку данные ферменты используются патогеном для деградации полимеров растительной клетки [13].

Исходя из полученных данных сорта пшеницы: Башкирская 26, Симбирка, Казахстанская 10, в связи с повышением пектиназной активности и снижением активности ингибиторов пектиназ при инфицировании характеризуется нами как менее устойчивые среди исследованных сортов.

Наблюдение за ростом возбудителя септориоза на эпидермисе листьев различных сортов пшеницы также выявило различия в степени развития гриба. Так, на листьях пшеницы сорта Казахстанская 10 уже через 24 ч после инфицирования в местах нанесения спор появлялись слабые хлорозы и некрозы. Признаки развития септориоза на листьях Омская 36, Симбирка, Башкирская 26, Казахстанская 10 наблюдались через 48 ч после инфицирования в виде слабого обесцвечивания листьев с последующим их побурением, а через 72 ч после инокуляции спорами симптомы септориоза проявлялись в виде бурых пятен с пушистым налетом мицелия (Рис. 1- 2,3,4,5). В листьях растений сорта Омская 35 в указанные сроки симптомы болезни были слабо выражены (Рис. 1- 2).

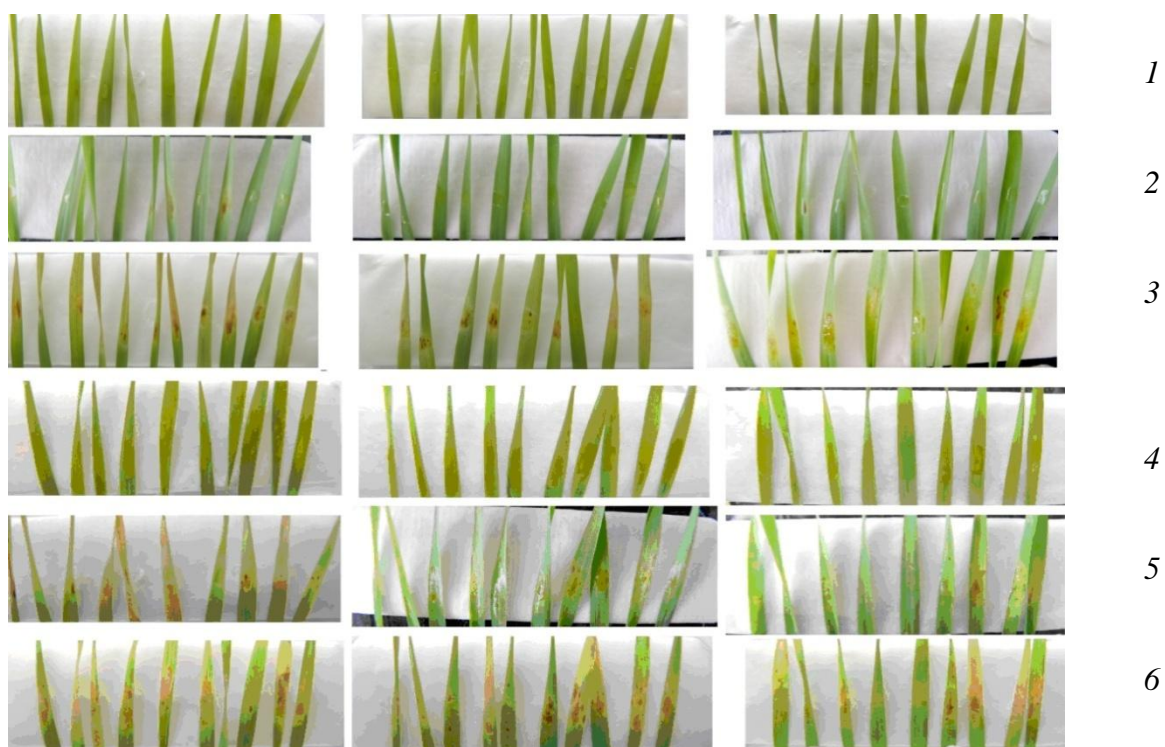


Рис. 1. Развитие возбудителя септориоза на листьях пшеницы различных сортов 72 ч после инокуляции. 1. Неинокулированные листья сорт Казахстанская 10 (контроль), 2. Омская 35, 3.Симбирка, 4. Башкирская 26, 5. Омская 36, 6. Казахстанская 10.

Таким образом, наибольшую устойчивость к инфицированию возбудителем септориоза проявляли растения пшеницы сорта Омская 35, наименьшую – сорта Казахстанская 10. Сорта пшеницы Омская 36, Симбирка и Башкирская 26 занимали по степени инфицируемости растительных тканей патогенным грибом *S. nodorum* промежуточное положение.

Полученные данные по изменению активности пектиназы и ингибиторов экзогенной пектиназы позволяют нам ранжировать исследованные сорта мягкой пшеницы по степени устойчивости к септориозу в следующем порядке: Омская 35 > Омская 36 > Башкирская 26 > Симбирка > Казахстанская 10, что

согласуется с данными, полученными при визуальной регистрации степени поражения листьев при заражении.

Исходя из полученных результатов мы можем рекомендовать лабораторное определение активности пектиназ и ингибиторов экзогенных пектиназ в растительных тканях для определения степени устойчивости растений к инфицированию грибными патогенами.

Работа выполнена при поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы (ГК № 16.740.110061).

Библиографический список

1. Tarr C. Основы патологии растений. М.: Мир, 1975. - 587 с.
2. Езепчук Ю.В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий. М.: Наука, 1977. - 215 с.
3. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология: учебное пособие. М.: Изд. Общество фитопатологов. 2001. - 302 с.
4. Koller W., Trial F. Role of cutinase in the invasion of plants: Pap. IMC' 5: 5th Int. Mycol. Congr., Vancouver, Aug. 14 21, 1994. Parker//Can. J.Bot- 1995.-73, Suppl. 1 Sec.E-H.-P. 1109- 1118.
5. Wattad E., Kobiler D., Dinoor A., Prusky D. Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits: cDNA cloning and involvement in pathogenicity // *Physiol, and Mol. Plant Pathol.* 1997. - 50, № 3. - P. 197-212.
6. Dumas B., Boudart G., Centis S. et al. Endopolygalacturonases of *Colletotrichum lindemuthianum*: Molecular characterization, gene expression, and elicitor activity / // *Phytoparasitica* - 1998.- 26, № 4.- P. 353.
7. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2005. Т.41. №3. С. 261-282.
8. Конарев Ал. В. Системы ингибиторов гидролаз у злаков - организация, функции и эволюционная изменчивость // Автореф. дисс. докт. биол. наук. - М.: 1992.- 38 с.
9. Кладницкая Г.В., Валуева Т.А., Ермолова Н.В. Накопление ингибиторов протеиназ в диффузатах клубней картофеля при инфицировании возбудителем фитофтороза // *Физиол. растений* - 1996.- Т.43, № 5. - 701 - 706.
10. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам. Уфа: Гилем, 2006. -232 с.
11. Шпирная И.А., Умаров И.А., Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И. Определение активности гидролаз и их ингибиторов по гидролизу субстрата в геле агарозы // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2009. Т.45. № 4. С.497-501.
12. Кобыльский Г.И. Патогенность дейтеромицетов: На примере возбудителя септориоза пшеницы - гриба *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. // Автореф. дисс. докт. биол. наук. - Тамбов: 2005.- 42 с.:
13. Кретович В.Л. Биохимия растений. М.: Высшая школа.-1986. -С.503.

УДК 631.4

Лопатин Н. В., Киреева Н. А., Григориади А. С.

ФГБОУ ВПО Башкирский государственный университет, г. Уфа

КОМПЛЕКСНАЯ БИОРЕМЕДИАЦИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

Ключевые слова: нефть; биоремедиация; фиторемедиант; биопрепарат; восстановление; дягиль лекарственный (*Archangelica officinalis*).

Загрязнение почв нефтепродуктами происходит повсеместно в условиях активного развития нефтедобычи, нефтепереработки и нефтехимической промышленности. Для каждого района существует свой региональный фон содержания углеводов в почве. Этот фон колеблется в широких пределах – от 10 до 500 мг на 1 г сухого веса почвы. В этих пределах нефтепродукты не оказывают заметного вредного влияния на окружающую среду.

Почвы считают загрязненными, когда концентрация нефтепродуктов достигает такой величины, при которой начинаются негативные изменения в почвах и окружающей среде, нарушается биологическое разнообразие, наблюдается гибель одних микроорганизмов и гипертрофированный рост других, падает биологическая продуктивность или наступает гибель растений, отмечается деградация почв. Законодательно утвержденный минимальный уровень содержания нефтепродуктов, выше которого наступает ухудшение качества природной среды (ПДК) до настоящего времени не установлен в большинстве стран, в том числе и в России.

Почвы обладают способностью самоочищения за счет деятельности микроорганизмов и физико-химической деструкции нефти под действием абиотических факторов. Однако эта способность ограничена, поэтому устанавливается такой уровень концентрации нефтепродуктов, выше которого почва не может справиться с загрязнением. Этот уровень называют пределом потенциала самоочищения (ППС). Почвы, содержащие нефтепродукты выше ППС, подлежат рекультивации.

Технология рекультивации земель, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, зависит от многих факторов: концентрации нефти в почве, типа нефти, наличия средств рекультивации – технических и химических средств, сорбентов, биопрепаратов, удобрений и т.д.

Целью работы являлась оценка эффективности комплексной биоремедиации почвы, загрязненной нефтяными углеводородами.

Объектам исследований была серая лесная почва (республика Башкортостан, загрязненная нефтью в концентрациях 4,7 и 8,5% масс, а так же растения дягиля лекарственного *Archangelica officinalis*, используемого в качестве фитомелиоранта. На первом этапе рекультивации для очистки почвы применили препарат Универсал, разработанный на основе нефтеокисляющих бактерий *Rodococcus equi*, выделенных из загрязненных нефтью почв Усинского и Ухтинского районов Республики Коми [1].

Оценка биологической активности почвы осуществлялась по следующим параметрам: ферментативная активность, численность различных эколого-трофических групп микроорганизмов. Каталазная активность определялась газометрическим методом [2]. Определение численности микроорганизмов почвы и ризосферы растений проводили в соответствии с общепринятыми методами посева [3]. Определение содержания остаточных нефтепродуктов в почве проводили горячей экстракцией хлористым метиленом [4].

Для оценки влияние рекультивации на состояние загрязненной почвы важен многосторонний подход, включающий доклеточный уровень. Каталаза является одним из самых чувствительных ферментов к изменению условий окружающей среды. Она косвенно влияет на детоксикацию и минерализацию углеводов нефти: в процессе разложения H_2O_2 образуется свободный O_2 , который используется аэробными микроорганизмами, участвующими в разложении нефти [5]. В начале эксперимента значения активности каталазы в пробах с загрязнением 4,7%, как обработанных так и без препарата, превышали таковые в контрольных образцах. Исследование показало, что использование Универсала в первый год проведения рекультивационных мероприятий, оказало положительное влияние на ферментативную активность сильнозагрязненной почвы. Через 90 сут. данный показатель в обработанной почве нормализовалась и соответствовала уровню контрольного варианта опыта.

Другим важным параметром оценки эффективности рекультивации является характеристика количественного и качественного состава микроорганизмов различных эколого-физиологических групп. Нефть ингибировала развитие микроорганизмов, использующих органические формы азота, в начале эксперимента (3 сут) в образцах серой лесной почвы. Заметная положительная динамика отмечалась только через 90 сут в образцах, загрязненных нефтью в концентрации 8,5%.

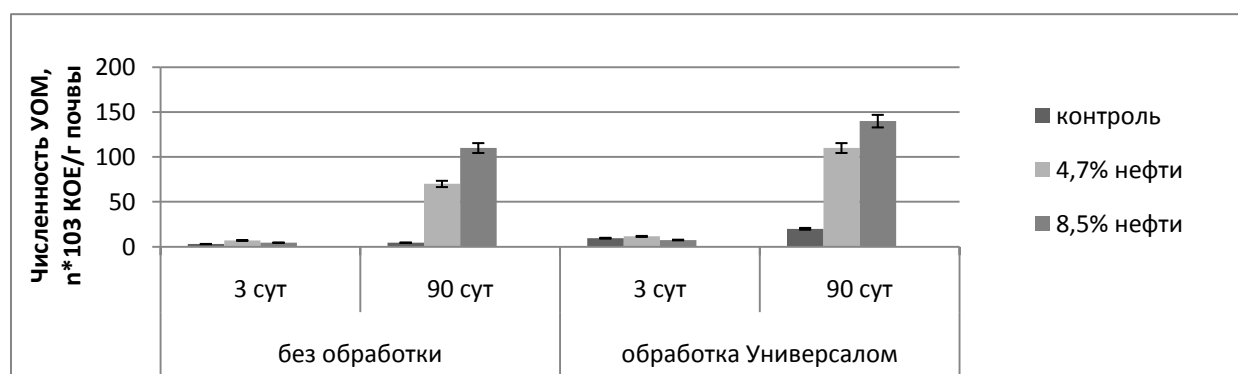


Рис. 1. Изменение численности углеводородокисляющих микроорганизмов в нефтезагрязненной и рекультивируемой почве

Поступление нефтяных углеводов в серую лесную почву в умеренных концентрациях стимулировало развитие микроорганизмов, использующих минеральные формы азота. С течением времени стимулирующий эффект усиливался. При содержании поллютанта 8,5% в почве Универсал проявил

наибольшую активность. Через 90 сут в обработанных препаратом образцах показатель превышал фоновое значение в 2,5.

Внесение нефтяных углеводов в почву также приводило к росту специфической группы микроорганизмов, отвечающей за деструкцию поллютанта. В соответствии с ростом концентрации поллютанта в почве увеличивалась численность углеводородоксилирующих микроорганизмов (УОМ). В начале эксперимента численность УОМ находилось на уровне контрольного варианта. С течением времени микробоценоз адаптировался к условиям нефтяного стресса. Через 90 сут показатель численности микроорганизмов-деструкторов значительно превышал соответствующее значение в необработанных образцах (рис. 1).

Таким образом, микробный препарат стимулировал развития тех группы микроорганизмов, которая способна к минерализации и деградации органических веществ, включая нефтяные углеводороды, которые в избытке поступили в почву в результате загрязнения.

На втором этапе реультикации на участки были высажены растения дягиля лекарственного (*Archangelica officinalis*). На второй год исследования каталазная активность контрольной почвы выше, что обусловлено климатическими условиями. В начале эксперимента уровень активности фермента хотя и был стабильно высоким, но не превышал соответствующие показатели в незагрязненной почве на протяжении всего периода исследования.

Наибольшая активность каталазы отмечена при загрязнении почв с первоначальной концентрацией 4,7% через 30 сут с начала эксперимента, что, вероятно, связано с повышением уровня окислительно-восстановительных реакций биodeградации нефтяных углеводов, идущих при непосредственном участии данного фермента [2]. В остальных вариантах опыта наблюдалось ингибирование фермента, при этом значения этого показателя были снижены в два раза. Спустя 60 сут этот показатель возростал, однако следует отметить, что рост активности фермента происходил и в почве контрольного варианта.

Микроорганизмы ризосферы играют важную роль в развитии растений, благодаря минерализации органического вещества, синтезу биологически активных веществ, азотфиксации и т.д. [6]. Также известно, что аккумуляция и внутритканевый метаболизм растения при фиторемедиации могут стимулировать деградацию загрязнителей через свою корневую систему именно за счет ризосферной микробиоты [7]. Таким образом, изучение влияния нефтяного загрязнения почвы на численность некоторых физиологических групп микроорганизмов ризосферы дягиля является важным параметром при оценке развития растительности в условиях стресса.

Одной из важных характеристик почвенной микробиоты является общая численность гетеротрофных микроорганизмов. При нефтяном загрязнении почвы в первые 3 суток в ризосфере дягиля общая численность гетеротрофных микроорганизмов значительно снизилась под воздействием поллютанта. Через 90 суток их общая численность в ризосфере растений возросла. Максимальные значения показателя регистрировались в образцах с содержанием нефти 3,15%,

при этом они превышали контрольные значения в 3 раза. Однако концентрация нефти 6,03% ингибировала этот процесс (табл. 1).

Таблица 1 Влияние загрязнения нефтяными углеводородами на некоторые группы микроорганизмов ризосферы и эдафосферы дягиля лекарственного

Группы микроорганизмов	Концентрация нефти, %	Ризосфера		Эдафосфера	
		3 сут	90 сут	3 сут	90 сут
Гетеротрофные микроорганизмы, КОЕ/г почвы	0	19,3±1,5	36,5±3,2	19,1±0,8	6,4±0,3
	3,15	8,0±0,75	112,7±5,0	12,6±0,4	11,7±0,7
	6,03	41,2±4,2	28,0±4,5	24,8±1,2	15,1±0,9
Микроорганизмы использующие минеральные формы азота, 10 ⁵ КОЕ/г почвы	0	65,0±9,7	116,7±6,3	27,2±4,3	38,0±0,9
	3,15	73,0±3,2	241,7±16	58,2±4,8	53,2±3,7
	6,03	201±24	217,8±5,3	84,9±6,2	46,5±4,2

В результате попадания нефти в почву увеличивается содержание органического вещества. Начавшиеся процессы естественной деградации углеводородов делают их доступными для микроорганизмов, которые могут использовать эти вещества в качестве дополнительного источника питания. Возможно именно это способствовало повышению микробиологической активности в среднезагрязненной почве.

Загрязнение почвы нефтью на протяжении всего периода исследования стимулировало развитие микроорганизмов, использующих минеральные формы азота. Таким образом, как показали наши исследования в ризосфере дягиля лекарственного, используемого для фиторемедиации нефтезагрязненных почв, складываются благоприятные условия для развития микроорганизмов, использующих органические и минеральные формы азота. Минерализация происходит активно во всех варианта опыта, наибольший коэффициент принадлежит пробе с концентрацией поллютанта 3,15 % на третьи сутки эксперимента (табл. 2).

Таблица 2 Коэффициент минерализации под посевами дягиля лекарственного

Концентрация нефти, %	ризосфера		эдафосфера	
	3 сут.	90 сут.	3 сут.	90 сут.
0	3,37	3,2	1,42	5,94
3,15	9,12	2,14	4,62	4,55
6,03	4,9	7,78	3,42	3,08

Анализ результатов исследований в лабораторных условиях показал, что в присутствии фитомелиорантов в нефтезагрязненной почве происходило постепенное увеличение численности УОМ в течение всего периода исследования. Было показано, численность УОМ в ризосфере дягиля

увеличивалась в 30-35 раз (при 3,15% и 6,03%-ном уровнях загрязнения нефтью) по сравнению с численностью УОМ в ризосфере растений, произрастающих на незагрязненной почве.

При этом численность УОМ в ризосфере растений превышала значения данного показателя в эдафосфере (зоне, находящейся вне влияния корней растений) в 2 раза, что может служить доказательством интенсификации микробиологических процессов в прикорневой зоне и непосредственным доказательством протекания процессов ризодеградации нефтяных углеводородов.

Одним из главных показателей, по которым определяется степень эффективности проведения ремедиационных работ, является содержание остаточных нефтепродуктов под посевами растений. Перед обработкой загрязненных участков почвы был проведен анализ содержания остаточных углеводородов. Было показано, что на двух участках концентрация нефтяных углеводородов составила 4,7 и 8,5 г/100г почвы.

При обработке Универсалом содержание остаточных углеводородов в почве в первый год составило 67 и 71% в образцах средне и сильно загрязненной почвы соответственно. Выращивание фитомелиоранта на почвах, загрязненных нефтью, способствовало интенсификации процессов снижения содержания остаточных углеводородов (рис. 2). Отмечено, что под посевом дягиля произошла деградация около 46,1% углеводородов при начальной концентрации загрязнителя в почве 3,15% и 59,2% – при 6,15% спустя 90 сут с начала эксперимента.

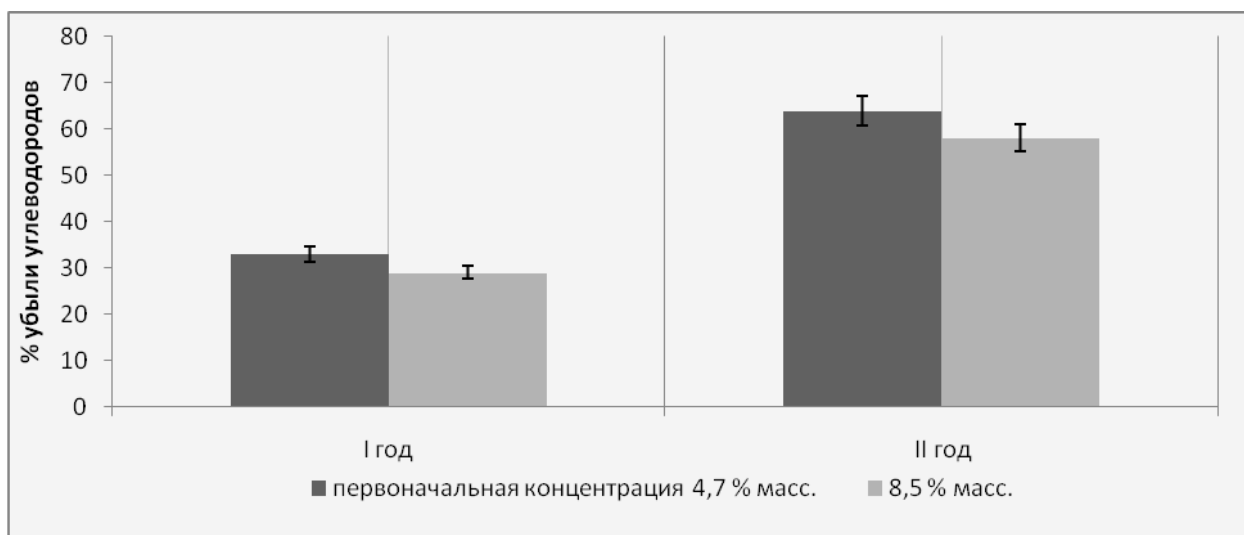


Рис. 2 Степень деградации остаточных углеводородов при комплексной биоремедиации

Таким образом, за два года проведения восстановительных работ было достигнуто снижение концентрации остаточных углеводородов в среднем на 60%. Под воздействием биопрепарата и фиторемедианта происходило стимулирование каталазная активность почвы и увеличение специализированной группы микроорганизмов за счет их искусственного

внесения, а также стимулирование микроорганизмов, использующих минеральные формы азота, что привело к активному протеканию процессов минерализации. Под посевами дягиля численность УОМ возросла в 30 раз по отношению к контролю. Однако применение фиторемедиации целесообразно только в том случае, когда содержание загрязнителя в почве не будет летальной для растений.

Библиографический список

1. Маркарова, М.Ю. Опыт применения биопрепарата "Универсал" для рекультивации нефтезагрязненных земель /М.Ю. Маркарова // Вест. Института Биологии Коми НЦТУрО РАН.– 2004. – №84.
2. Хазиев, Ф.Х. Методы почвенной энзимологии / Ф.Х. Хазиев. – М.: Наука, 2005. – 252 с.
3. Методы почвенной микробиологии и биохимии /Под ред. Д.Г.Звягинцев. – М., 1991. – 304с.
4. McGill W.B., Rowell M.J. Determination content of oil contaminated soil // Sci. Total/ Environ., 1980. v. 14.№3. P. 245–253.
5. Киреева Н.А., Бакаева М.Д. Рекультивация нарушенных земель. Уч. пособие. – Уфа: РиО БашГУ, 2005.-208 с.
6. Bertin, C. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. / C. Bertin, X. Yang, L. Weston // Plant and Soil. – 2003. – V. 256. – P.67-83.
7. Турковская, О.В. Биодegradация органических загрязнителей в корневой зоне растений / О.В. Турковская, А.Ю. Муратова // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциированных микроорганизмов с растениями. – М.: Наука, 2005. – С. 180-208.

УДК 632.937.15, 577.18, 579.852.11

Лукьянцев М.А.¹, Хайруллин Р.М.²

¹ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, г. Уфа

²ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS*

Ключевые слова: эндофитные бактерии; продукты метаболизма; антагонизм; фитопатогенные грибы; стимуляция роста.

С каждым годом во всем мире возрастает потребность в производстве безопасных для здоровья продуктов питания, что, в свою очередь, требует повышения эффективности и "экологичности" методов предотвращения и борьбы с болезнями культурных растений и снижение количества удобрений и химических стимуляторов, вносимых на поля [1]. Одним из наиболее перспективных и интенсивно разрабатываемых подходов для решения этой проблемы является осуществление биологического контроля возбудителей болезней растений посредством искусственного введения в агроценозы

эффективных штаммов микроорганизмов, способных как защищать растения от фитопатогенов, так и оказывать ростстимулирующее воздействие [2, 3]. Активные разработки в этом направлении ведутся уже более 20 лет, однако до сих пор существует ряд нерешенных проблем, среди которых следует отметить следующие: низкая конкурентоспособность лабораторных штаммов в естественных условиях с одной стороны, и дополнительное "загрязнение" продукции привнесенными микроорганизмами с другой. Если первая проблема может быть решена благодаря использованию эндофитных микроорганизмов [4], заселяющих внутренние ткани растений, то в возможный вариант решения второй проблемы - использование освобожденных от клеток метаболитов эндофитных микроорганизмов. В связи с этим целью данной работы явилось исследование новых регуляторов роста растений на основе метаболитов эндофитных штаммов *B. subtilis*.

Для проведения комплексной оценки полезных свойств метаболитов эндофитных бацилл и преимуществ препаратов на их основе мы очертили круг основных направлений исследования. К наиболее существенным свойствам метаболитов в качестве основы биопрепаратов для растениеводства можно отнести рострегулирующую и фунгицидную (фунгистатическую) активности; преимуществами препаратов на основе биологически активных соединений бактериального происхождения могут быть стабильность при хранении и возможность концентрирования препаратов, а также включение в их состав целевых добавок-стимуляторов роста растений. Степень проявления полезных свойств метаболитов находятся в прямой зависимости не только от индивидуальных особенностей штамма микроорганизма-продуцента, но и от условий получения целевого продукта. В связи с этим, для достижения указанной цели нами были сформулированы задачи исследования:

1) Оценить ростстимулирующую и фунгицидную активности метаболитов эндофитных антагонистов *B. subtilis*, выбрать наиболее перспективные штаммы для создания биопрепаратов комплексного действия.

2) Подобрать оптимальные питательные среды и условия культивирования для максимальной продукции метаболитов перспективных штаммов.

3) Выделить группу компонентов из состава метаболитов и оценить их биологическую активность.

4) Повысить эффективность экспериментальных препаратов путем введения целевых добавок в их состав.

Методы исследования.

Метаболиты эндофитных штаммов получали, культивируя бактерий в жидкой питательной среде в колбах на шейкере при 37°C до спорообразования (72-96 часов). Отделяли культуральную жидкость от бактериальной биомассы в два этапа: сначала дважды центрифугировали жидкую микробную культуру при 5000 и 12000 об/мин и температуре +5°C. Полученный супернатант подвергали стерильной фильтрации через нитроцеллюлозные фильтры Millex с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США). Полученный стерильный фильтрат использовали в дальнейших экспериментах.

Оценку фунгицидного/фунгистатического действия метаболитов проводили с использованием двух методов. 1) Культуральную жидкость исследуемых штаммов, полученную способом, описанным выше, добавляли в стерильный теплый картофельно-глюкозный агар до застывания агара. Среду быстро разливали по чашкам Петри и давали агару застыть. Инокулировали поверхность среды тест-культурой гриба на агаровых блоках, вырезанных из пластинок питательной среды, прединокулированной микромицетом. Выдерживали чашки в термостате при 25°C в течение 2-3 суток, после чего измеряли площадь зоны роста фитопатогена и выражали полученные значения как % от площади зоны роста в контроле (100%).

2) Методом двухслойной агаризованной среды накапливали метаболиты штаммов в агаре, после чего инокулировали полученные среды тест культурой способом, описанным выше. Результаты эксперимента представляли так же, как и в методике 1.

Ростстимулирующую активность метаболитов оценивали, проращивая семена сельскохозяйственных культур в чашках Петри в растворах культуральная жидкость-вода с разной концентрацией культуральной жидкости (КЖ). Проращивание проводили в темноте при 25°C в течение 3 суток. У проростков измеряли длину наиболее длинного корня и побега. Использовали 2 повтора для каждого варианта.

На этапе подбора питательных сред для получения биологически активных метаболитов эндофитных штаммов использовали питательные среды различного состава – мясо-пептонный бульон, картофельно-глюкозный отвар, полусинтетическая среда (ПСС) и питательный бульон. Прочие условия культивирования были одинаковы во всех экспериментах: 37°C, 100 мл среды в колбах на 250 мл, скорость перемешивания – 180 об/мин. Продолжительность культивирования варьировала в зависимости от скорости спорообразования в культуре.

При оценке эффективности внесения целевых добавок в состав среды культивирования штаммов для усиления продукции ими биологически активных веществ использовали следующие химические соединения и биологические объекты: сульфат железа, глутаминовая кислота, нежизнеспособный мицелий *F. avenaceum*, триптофан и дрожжевой экстракт. Полученную после культивирования штаммов в средах с добавками культуральную жидкость тестировали на наличие интересующей на биологической активности согласно методикам, описанным выше.

Выделение отдельных фракций метаболитов из состава культуральной жидкости штаммов осуществляли несколькими методами. 1) Культуральный фильтрат подкисляли 6N соляной кислотой до pH 2,0 для осаждения фракции с возможными липопептидными антибиотиками. Выдерживали подкисленный фильтрат в холодильнике несколько часов для полного осаждения компонентов фильтрата. После чего центрифугировали КЖ при 12000 об/мин, отделяли и сохраняли супернатант, осадок собирали и растворяли в спирте, после чего раствор вновь центрифугировали, удаляли осадок, спирт упаривали, полученную сухую субстанцию оценивали на наличие биологической

активности. Водный остаток, полученный после первого центрифугирования, также тестировали на наличие биологической активности.

2) Экстрагировали вещества из состава КЖ диэтиловым эфиром. Полученный экстракт освобождали от расторителя, остаток тестировали на наличие биологической активности.

При оценке биологической активности выделенных фракций, ростстимулирующую активность оценивали способом, описанным выше, используя водные растворы фракций; фунгицидную/фунгистатическую активность оценивали, нанося раствор (водный или спиртовый) на бумажные диски, упаривая растворитель и помещая диски в чашки Петри на поверхность среды, инокулированной смывом с мицелия тест-гриба. Инкубировали чашки при 25°C 2-3 суток, после чего измеряли зону подавления роста тест-культуры вокруг дисков.

В экспериментах по оценке влияния целевых добавок в составе метаболитов на рост растений использовали соединения цинка, молибдена и бора. Вносили добавки из расчета (г/т семян): цинк (в виде сульфата цинка) 40 и 60, молибден (в виде молибдата аммония) 20 и 40, бор (в виде борной кислоты) 50 и 100. Семена предобработывали растворами с расчетным количеством добавок и проращивали в чашках Петри в растворах метаболитов.

Результаты и их обсуждение.

Предварительная оценка ростстимулирующей и фунгицидной активностей метаболитов эндофитных штаммов *B. subtilis* выявила наличие обеих у всех использованных штаммов в той или иной степени.

Влияние состава питательной среды на продукцию биологически-активных метаболитов оказалось значительным. Согласно полученным результатам в дальнейшей работе были использованы среды ПСС (для продукции ростстимулирующих метаболитов) и картофельно-глюкозный отвар (для продукции фунгицидных/фунгистатических веществ). Внесение целевых добавок в состав сред культивирования штаммов привело к усилению антигрибного эффекта. Однако ростстимулирующая активность метаболитов после внесения в среду культивирования триптофана увеличилась у некоторых штаммов и лишь незначительно.

Проведенные исследования позволили заключить, что для проявления метаболитами штаммов фунгицидного эффекта требовались гораздо большие их количества, чем для проявления ростстимулирующего действия. Причем, в разбавленных метаболитах терялся антигрибной эффект, но значительно повышалась стимуляция роста, а при использовании концентрированных метаболитов фунгицидный эффект наблюдался с одновременным сильным ингибированием роста растений пшеницы. Поэтому в дальнейшем решено было отказаться исследования фунгицидной активности жидких метаболитов и продолжить исследование их рострегулирующих свойств.

Среди выделенных фракций метаболитов у «кислого осадка» проявился антигрибной эффект, однако ростстимулирующий эффект фракции, экстрагированной эфиром был незначительным из-за, возможно, недостаточно

полной экстракции веществ из состава фильтрата. Концентрированные растворы всех фракций подавляли рост растений.

В связи со сложностями процесса экстракции и благодаря выявленной способности культуральной жидкости штаммов стимулировать рост растений в низкой концентрации решено было включить в программу дальнейших исследований лишь культуральные жидкости перспективных штаммов, полученную в оптимальных условиях.

Для усиления ростстимулирующего эффекта метаболитов исследовали возможность включения целевых добавок в состав метаболитов (таблица 1). Ростстимулирующий эффект метаболитов некоторых из перспективных штаммов оказался достоверно усилен внесением добавок, причем превышал таковой при использовании только растворов солей микроэлементов. Метаболиты штамма 11ВМ обладали значительным ростстимулирующим действием независимо от вида и количества добавки.

Таблица 1 Рострегулирующее действие исследованных метаболитов в сочетании с микроэлементами

Штамм (метаболиты)	Длина корней и побегов проростков пшеницы, мм							
	Mo, 20 г/т семян		Zn, 40 г/т семян		B, 50 г/т семян		Вода	
	Корень	Побег	Корень	Побег	Корень	Побег	Корень	Побег
121PH	46,21	32,38	46,11	31,52	68,83	39,69	56,11	32,93
161PH	45,20	30,50	58,12	36,73	59,03	40,72	52,96	33,56
11В	58,78	31,37	57,36	31,76	60,64	32,88	52,65	33,73
11ВМ	62,76	33,24	56,96	31,61	63,60	34,72	66,72	36,08
26Д	55,52	31,32	58,52	35,28	55,43	34,04	54,04	34,88
11PH	44,00	24,14	55,20	32,76	58,50	33,12	50,75	32,88
832PH	59,67	31,29	50,93	30,15	61,15	30,81	57,21	33,83
922PH	48,39	28,83	64,34	37,45	70,23	41,27	61,38	36,34
Вода	56,00	31,73	55,81	32,56	66,35	34,15	43,72	32,00

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить среди исследованных штаммов наиболее перспективных продуцентов биологически активных метаболитов. В форме неочищенной культуральной жидкости метаболиты оказались способны подавлять рост фитопатогенов и стимулировать рост растений, однако действие это проявлялось при различных концентрациях растворов метаболитов. Вследствие этого оптимальным решением оказался отказ от фунгицидной активности в пользу ростстимуляции. Усиление последней было достигнуто за счет введения в состав экспериментальных препаратов целевых добавок в виде соединений микроэлементов. В результате данного эксперимента выявились штаммы-лидеры, метаболиты которых в комбинации с микроэлементами стимулировали

рост проростков пшеницы на 15-20% лучше, чем отдельно взятые микроэлементы.

Библиографический список

1. Недорезков В.Д. Биологическое обоснование применения эндофитных бактерий в защите пшеницы от болезней на Южном Урале. – Дисс. д-ра с.-х. наук. – Уфа, 2003. – 280 с.

2. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects / S. Compant [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 9. – P. 4951–4959.

3. Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere / J.M. Whipps // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52. – P. 487–511.

4. Strobel, G.A. Endophytes as sources of bioactive products / G.A. Strobel // Microbes and Infection. – 2003. – Vol. 5. – P. 535–544.

УДК 577.2:575:576.89

Лысенко А.Н., Гончаренко Г.Г., Катохин А.В.

УО «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», Республика Беларусь, г. Гомель

ПЦР-ДИАГНОСТИКА *OPISTHORCHIS FELINEUS* ПО ITS2-МАРКЕРНЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ В ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ХОЗЯЕВАХ – МОЛЛЮСКАХ-БИТИНИЯХ И РЫБАХ СЕМЕЙСТВА КАРПОВЫЕ

Ключевые слова: описторхоз; *Opisthorchis felineus*; степень зараженности; промежуточные хозяева; рибосомальный ген; ITS2-маркер; праймеры; амплификация; ПЦР; электрофорез

Введение. Описторхоз (*opisthorchosis*) – опасное заболевание человека, домашних и диких животных, вызываемое паразитированием в желчных протоках печени, желчном пузыре, поджелудочной железе половозрелых особей кошачьей двуустки – *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884). При длительном течении описторхоз вызывает хроническое заболевание печени, желчного пузыря и поджелудочной железы, способствует раку печени и желчных протоков [1]–[4].

Перед попаданием в человека и животных *O. felineus* проходит личиночные стадии развития в промежуточных хозяевах – пресноводных моллюсках *Vithynia leachi* (Shepard, 1823) и рыбах семейства карповые (Cyprinidae).

На этих стадиях видовая идентификация представителей семейства Opistorchiidae по морфологическим признакам очень трудоемкая и дорогостоящая, а в ряде случаев просто невозможна.

В связи со всем вышеизложенным, разработка эффективных методов видовой диагностики на основе современных молекулярно-генетических

технологий (таких как полимеразная цепная реакция анализа фрагментов ДНК со специфическими праймерами) приобретает особую актуальность.

Целью исследований была разработка методов ПЦР-диагностики по ITS2-последовательностям рибосомального кластера для выявления возбудителей описторхоза в промежуточных хозяевах моллюсках-битиниях и рыбах семейства карповые.

Материалы и методы исследования. Объект исследования - в качестве объекта исследования использовались церкарии описторхид, полученных из зараженных моллюсков *Bithynia leachi* и метацеркарии из рыб семейства карповые, собранных в период с июня по сентябрь 2011 года на реках Гомельщины: Сож, Березина и Припять. Материал помещали в 70-процентный этанол и хранили при -20°C .

Визуальное обнаружение живых церкарий и их отделение от гепатопанкреаса битиний проводилось с использованием стереоскопического микроскопа МБС-10 (Россия). Для детализации внутреннего строения использовался витальный краситель – *нейтральный красный*.

Установлено, что кариотип *O. felineus* состоит из 7 пар хромосом, а величина гаплоидного генома имеет около 300 млн пар нуклеотидов.

Выделение геномной ДНК *O. felineus*. Для анализа методов выделения общей ДНК описторха нами было проведено вскрытие моллюсков *Bithynia leachi* с выделением из них гепатопанкреаса [5], содержащего спороцисты с редиями *O. felineus*. Также нами было проведено вскрытие рыб семейства Cyprinidae с выделением из них компрессионным методом [6] цист, содержащих метацеркарий *O. felineus*, из которых и проводилось выделение ДНК.

В ходе выделения геномной ДНК было использовано несколько методов. Наилучшие результаты были получены с помощью метода фенольной экстракции, с использованием ионно-обменной смолы и СТАВ-метода.

Метод фенольной экстракции: Экстракция. Предварительно гепатопанкреас был помещен в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую гидролизирующий экстрагирующий буфер следующего состава: 100 mM раствор Трис, 0,005M EDTA, 1% лаурилсульфата натрия (SDS) (рН буфера довели до значения 7,8) и 25 мг протеиназы К. Полученную смесь инкубировали при 37°C всю ночь. **Осаждение ДНК.** 1) Далее пробу ДНК смешивали с равным объемом фенола или смеси фенол-хлороформ в полипропиленовой пробирке с пластмассовой крышкой. 2) Содержимое пробирки размешивали, пока не образуется эмульсия. 3) После этого проводили центрифугирование при $1600\times g$ в течение 3 минут при комнатной температуре. Если органическая и водная фазы разделились не достаточно хорошо, центрифугировали еще раз более продолжительное время или при большей скорости. 4) Верхний водный слой переносили пипеткой в новую полипропиленовую пробирку. Промежуточную фазу и нижнюю органическую фазу отбрасывали. Добавляли равный объем смеси фенола и хлороформа (1:1). Повторяли стадии 2–4. Добавляли равный объем хлороформа и повторяли стадии 2–4 [7]. **Очистка препарата ДНК.** Супернатант сливали, а

полученный осадок ДНК промывали 1000 мкл 65-процентного этанола, охлажденного до -10°C . После промывания содержимое пробирки центрифугировали при $15000 \times g$ ($T=4^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. Повторяли процедуру промывки 2–3 раза для удаления из осадка остатков EDTA. *Лиофилизация препарата ДНК.* После промывки этанолом пробирки размещали в штативе горизонтально и, открыв крышки, просушивали осадок ДНК в течение 30–40 минут ($T=45^{\circ}\text{C}$) до полного испарения этанола. *Растворение препарата ДНК.* Высушенный осадок растворяли в 30 мкл бидистиллированной и деионизированной воды при 40°C в течение 30 мин. Растворенную ДНК хранить при 4°C для дальнейшего анализа.

Метод выделения ДНК из битиний с использованием ионно-обменной смолы: *Экстракция.* Из печени инвазированного моллюска под бинокулярным микроскопом извлекали спороцисты и отдельные церкарии. Их промывали несколько раз в бидистиллированной воде для предотвращения загрязнения проб посторонней ДНК. Затем спороцисты и церкарии помещали по одному экземпляру в пробирки для ПЦР, куда вносили 50 мкл 5-процентной водной суспензии Chelex 100 (ионно-обменная смола, Bio Rad). В смесь добавляли 1 мкл протеиназы К до конечной концентрации в смеси 100 мкг/мл и инкубировали при 65°C 30 минут. Смесь перемешивали на центрифуге-вортекс Elmi каждые 10 минут. *Осаждение ДНК.* Далее смесь термостатировали 8 минут при 99°C и центрифугировали на микроцентрифуге Elmi 3 минуты при $12\,500$ об/мин. Надосадочную часть переносили в новые пробирки, хранили выделенную ДНК при -20°C [8].

Выделение суммарной ДНК упрощенным СТАВ-методом: *Экстракция и гомогенизация.* Образец, массой 40-50 мг, помещали в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую 400 мкл экстрагирующего буфера ($T=60^{\circ}\text{C}$) следующего состава: 2% р-р бромиды цетилтриметиламмония (СТАВ); 0,1 М раствор Трис; 1,4 М раствор хлорида натрия; 20 mM раствор EDTA-2Na (рН буфера довести до значения 8,0). Далее используя прокаленные стеклянные пестики проводили гомогенизацию материала при комнатной температуре в течение 30-40 с. По окончании гомогенизации пробирку с образцом закрывали и перемешивали содержимое на вихревом смесителе ($400-600$ мин⁻¹) в течение 5 с. После этого пробирки помещали на водяную баню и инкубировали в течение 60 мин при 60°C . *Очистка гомогенатов.* После экстракции пробирку охлаждали до комнатной температуры, и к образцу добавляли 400 мкл смеси хлороформа. Содержимое перемешивали на вихревом смесителе (200 мин⁻¹) в течение 2 мин при комнатной температуре. Далее центрифугировали при $13000 \times g$ ($T=18-20^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. *Осаждение ДНК.* По окончании центрифугирования пипеткой отбирали 350 мкл супернатанта, переносили в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, добавляли 300 мкл охлажденного изопропанола и оставляли на 20 мин, после чего центрифугировали при $13000 \times g$ ($T=18-20^{\circ}\text{C}$) в течение 20 мин. Полученный осадок промывали двукратно 500 мкл 65% этанола, охлажденного до -10°C . После промывания содержимое пробирки центрифугировали при $15000 \times g$ ($T=4^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин.

Лиофилизация препарата ДНК. После промывки этанолом пробирки размещали в штативе горизонтально и, открыв крышки, просушивали осадок ДНК в течение 30-40 мин ($T=45^{\circ}\text{C}$) до полного испарения этанола. **Растворение препарата ДНК.** Высушенный осадок растворяли в 100 мкл бидистиллированной и деионизированной воды во встряхивающей ванне (200 мин^{-1}) при 40°C в течение 30 мин. Растворенную ДНК хранили при 4°C для дальнейшего анализа.

Результаты исследования и их обсуждение

ITS2 ядерного рибосомального кластера как маркер для видовой диагностики описторхид. У эукариотических организмов рибосомальные гены представлены в виде **кластеров**, расположенных группами на разных хромосомах. В каждый кластер входит три (18S, 5,8S и 28S) **рибосомальных гена**, разделенных участками – так называемыми **спейсерами** (рисунок 1).

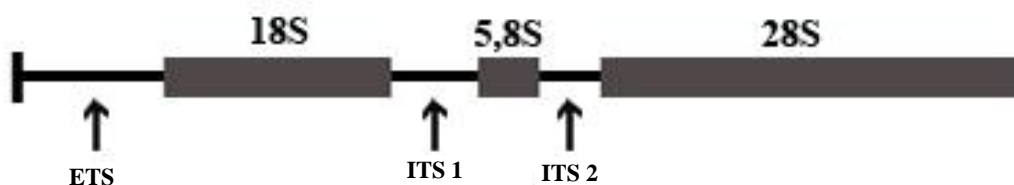


Рисунок 1

Схема строения рибосомального кластера:

ETS – внешний спейсер и ITS – внутренние спейсеры

Такая конструкция в геноме *O. felineus* повторена более сотни раз. Весь кластер содержит около 13 000 нуклеотидных пар.

При диагностике описторхоза – заболевания человека и животных, вызываемого кошачьей двуусткой (*O. felineus*) – в качестве маркера часто используется второй внутренний спейсер (ITS2) размером около **300 н.п.**

Использование этого маркера позволяет быстро и с высокой точностью идентифицировать виды описторхид даже для особей с практически неразличимыми морфологическими стадиями жизненного цикла, таких как яйца паразитов [9]–[10].

Конструирование праймеров для амплификации ITS2 спейсера, позволяющего проводить видовую идентификацию описторхид.

Целью разработки ПЦР-детекции была идентификация плоских червей семейства Opisthorchiidae с использованием **только одной праймерной системы**. Первоочередной задачей было получить простую систему детекции, которая позволила бы распознавать всех описторхид, используя только одно испытание, и в то же время отличать их от других видов Digenea, особенно от представителей близкого семейства Heterophyidae, или так называемых минутных плоских червей, которые паразитируют в кишечнике человека.

Для конструирования праймеров использовалась информация о нуклеотидных последовательностях видов *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis*

viverrini, *Opisthorchis felineus*, *Pseudamphistomum truncatum* и *Metorchis xanthosomus*, взятых нами из GenBank. Регистрационные номера в GenBank для *C. sinensis*, обнаруженного в Корее и Китае, AF217094 и AF217099 соответственно, а для *O. viverrini* – AF408147. Данные для *O. viverrini*, обнаруженные в различных областях северо-восточном Таиланда [11], были идентичны друг с другом и с показанными в GenBank.

Интересно отметить тот факт, что нуклеотидные последовательности ITS2 участка *O. felineus* ранее не были опубликованы Мюллером с соавторами в их ключевой работе [9] и не представлены в GenBank. Тем не менее ими была предложена экспериментальная пара праймеров следующего состава: прямой праймер (Fw) OP1: 5-CGAGGGTTCGGCTTATAAAC-3 и обратный (Rw) OP2: 5-AGCCTCAACCAAAGACAAAG-3.

Авторы подчеркивают, что следует учитывать возможные перекрестные реакции с ДНК других Дигеней *Echinostoma caproni*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, *Holostephanus dubenini* и *Paracoenogonimusovatus* [9].

Таким образом, принимая во внимание все вышеизложенные факторы, при конструировании оптимальных праймеров для выявления видоспецифичных участков ДНК для идентификации *Opisthorchis felineus* необходимо учитывать два главных параметра:

1) необходимо составлять такие праймеры, чтобы они лежали в консервативной области 5,8 S РНК или 28 S РНК, тогда исключается вероятность того, что он может не сработать для каких-то представителей описторхид;

2) необходимо подбирать праймеры таким образом, чтобы выходить на однораундный ПЦР-анализ.

Последовательность нуклеотидов ДНК спейсерного участка ITS2 (выделен черным) и 38 нуклеотидов прилегающих 5,8 и 28 S рибосомальных генов у *O. felineus* представлена ниже (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank ID: EF688132.1).

```
1 5'ccacgcctgt ccgagggtcg gcttataaac taccacgacg cccaanaagt cgtggcttgg
61 gtcttccag ctggcatgat tccccacgc atttgtgtgg ggtgccgat ctatggcttt
121 tcccaatgt gccgacgca accatgtctg ggctgactgc ctggatgagg ggggtggcgge
181 ggagtcgtgg ctcaattgt gttgttattg ttgtgaatgt gcgcgtccg ttgttgctc
241 tttgtctttg gttgaggctc cagtggtggc aatgcattcg atgcaaatct gttttgact
301 tcggtgctta actttcctga cctcgatc 3'
```

На первом этапе разработки ДНК-диагностической системы при выявлении видоспецифичных участков ДНК для идентификации описторхид в моллюсках и рыбах семейства карповые нашей целью было построить прямой праймер, который позволил бы начать амплификацию участка 5,8 S и, соответственно, всего спейсерного участка. После достраивания комплементарной цепочки 3'–5' в ней был подобран участок, которому комплементарен прямой праймер (Fw) следующего состава: OF1 5'-CGAGGGTTCGGCTTATAAAC-3'.

На втором этапе нами был сконструирован обратный праймер (Rv) из 20 нуклеотидов следующего состава: OF2 5'-AGCCTCAACCAAAGACAAAG-3',

позволяющий амплифицировать «горячий» фрагмент спейсерного участка.

Таким образом, сконструированная нами пара праймеров (*уточненные Muller et al, 2007*) позволяет амплифицировать участок ДНК размером в **248 нуклеотидов**.

Однако существует проблема внутривидовой изменчивости *O. felineus* относительно нуклеотидной последовательности в спейсере ITS2 [12], что требует использования для праймирования высококонсервативных участков ДНК – 5,8 S и 28 S рибосомальных генов. Наиболее перспективным является использование пары праймеров, позволяющей амплифицировать участок ДНК, включающий в себя фрагмент 5,8 S, полную последовательность ITS2 и фрагмент 28 S рДНК.

Так, группа молекулярных генетиков из Института цитологии и генетики СО РАН (г.Новосибирск) с успехом использует для амплификации спейсерного участка ITS2 у *O. felineus* праймеры другого состава: (F) прямой 5'-GAACATCGACATCTTGAACG-3' и (R) обратный 5'-GGAACGACCTGAACACCA-3', позволяющие амплифицировать больший фрагмент ДНК (**531 нуклеотид**), включающий весь спейсерный участок и прилегающие последовательности 5,8 S и 28 S рибосомальных генов. Эти два праймера были обозначены: **ITS2exFw** и **ITS2exRv**.

Ниже приведена последовательность спейсерного участка ITS2 (выделен черным) и нуклеотидов прилегающих 5,8 S и 28 S рибосомальных генов у *O. felineus*. В ней отмечены участки, которые использовались при конструировании подходящих праймеров, позволяющих амплифицировать весь участок ITS2 и прилегающие последовательности 5,8 и 28 S.

```
1 5'gctt[gaaca tcgacatctt gaacg]catat tgcggccatg ggttgcctg tggccacgcc
61 tgccgaggg tcggctata aactatcag acgcccmeta agtcgtggt tgggtcttc
121 cagctggcat gattcccca cgcatttgtg tggggtgccg gatctatggc tttcccca
181 tgtgccggac gcaaccatgt ctgggctgac tgctggatg agggggtggc ggcggagtcg
241 tggetcaatt gttgttgta ttgttgtaa tgtgcgcgt cgttgttg tctttgtct
301 ttggtgagg ctccagtgt ggcaatgcat tcatgcaaa tctgtttgc acttcggtgc
361 ttaactttcc tgacctgga tcagacgtga ttaccgctg aatttaagca tatcaataag
421 cggaggmeta gaaactaaca aggattccct cagtaacggc gagtgaacag gmetaagccc
481 agcaccgaag cctgtggcca attggtcact aggcaatgtg gtgttcaggt cgttccatag
541 aggt3'
```

Этапы амплификации ITS2 с полученными праймерами

На следующем этапе наших исследований мы провели сравнительный анализ праймеров по Muller *et al, 2007* [9] и Брусенцову и др., 2010 [13] и установили наиболее оптимальный вариант праймеров, позволяющих амплифицировать фрагмент ДНК *O. felineus*, содержащий ITS2 участок и прилегающие к нему консервативные области 5,8 и 28 S рибосомальных генов.

ПЦР проводили в объеме 25 мкл. В пронумерованные реакционные ПЦР-пробирки Ахуген (США) объемом 0,6 мл вносили смесь, содержащую: 2,5 мкл dNTP, по 1 мкл каждого праймера, 2,5 мкл 1x Taq Buffer, 1 мкл Taq-polymerase, 16 мкл Milli-Q Water, 1 мкл исследуемой ДНК. Тщательно перемешивали

пипетированием и затем сверху наслаивали 25 мкл минерального масла для ПЦР. После чего пробирки помещали в амплификатор. ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (Россия).

После серии проведенных экспериментов были установлены оптимальные термопрофили, позволяющие амплифицировать фрагмент ДНК *O. felineus*, содержащий ITS2 участок и прилегающие к нему консервативные области 5,8 и 28 S рибосомальных генов. Параметры оптимальных термопрофилей приведены ниже:

1 цикл	94 ⁰ С3 мин
30 циклов	94 ⁰ С45 сек
	58 ⁰ С.....30 сек
	72 ⁰ С60 сек
1 цикл	72 ⁰ С.....5 мин
хранение	10 ⁰ С.....∞

После амплификации полученный раствор с множественными копиями выделенного гена сохраняли в морозильной камере ($t \approx -20^{\circ}\text{C}$).

Выявление ампликонов проводили с помощью электрофореза в горизонтальной камере SE-1 Helicon (Россия). Электрофоретическое фракционирование проводилось с использованием трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ) буфера (рН = 8,0) в 2-процентном агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием. Электрофорез проводили в течение 20–25 минут при напряженности электрического поля 200–250 В.

Визуализацию ампликонов после электрофореза проводили с помощью облучения полученных агарозных гелевых пластин ультрафиолетом (длина волна 360 нм) на специальных установках.

Электрофоретическое выявление ампликонов ITS2 *O. felineus* в промежуточных хозяевах – моллюсках-битиниях.

На рисунке 2 представлена электрофореграмма выделенной геномной ДНК *O. felineus* (дорожка 1) и продуктов амплификации ДНК с праймерами ITS2exFw/ITS2exRv (дорожка 3). На дорожке 5 представлен спектр образца амплифицированной ДНК при стократном разбавлении. Хорошо видно, что ампликон имеет размер около 530 н.п. Таким образом, подобранные условия амплификации и праймеры позволяют четко выявлять ампликон содержащий весь спейсер ITS2 и прилегающие участки 5,8 и 28 S рибосомальных генов в исследуемом материале *O. felineus*.

На рисунке 3 представлена электрофореграмма образцов после амплификации с праймерами OF1/OF2, позволяющими амплифицировать участок ДНК только спейсера ITS2 размером около 250 н. п.

В ходе исследования материала гепатопанкреасов, выделенных из битинид, обитающих в водоемах Гомельщины, на предмет их зараженности описторхидами *O. felineus* нами была использована пара праймеров ITS2exFw/ITS2exRv. Электрофоретический спектр продуктов амплификации ДНК из материала гепатопанкреасов, выделенных у 6 битиний, представлен

на рисунке 4. Хорошо видно, что заражены только моллюски-битинии, образцы которых электрофорезированы на дорожках 2 и 6. Причем битинии заражены именно описторхидами вида *O. felineus*, поскольку величина выявленных фракций ДНК составляет около 530 н. п. (рисунок 4).

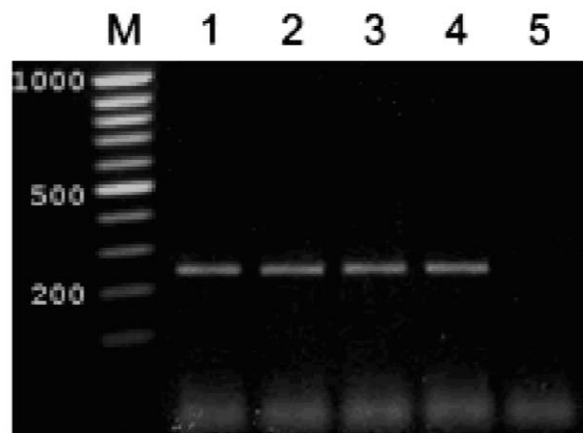


Рисунок 3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *O. felineus* с праймерами OF1/OF2

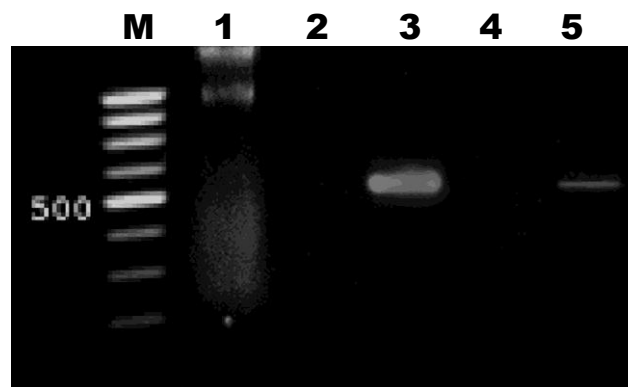


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *O. felineus* с праймерами ITS2ex

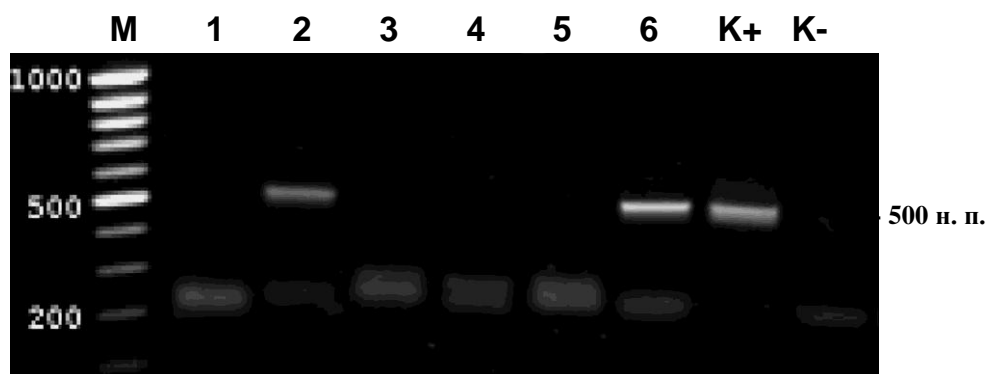


Рисунок 4. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *O. felineus* из материала гепатопанкреасов, выделенных из 6 битинид, обитающих в водоемах Гомельщины: М – маркер молекулярных масс, 100bp DNA Ladder; К⁻ – отрицательный контроль, реакция без ДНК; К⁺ – положительный контроль, реакция с ДНК *O. felineus*

Исходя из полученных на электрофореграмме данных, зараженность битиний описторхидами вида *кошачья двуустка* составила около 33%.

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были разработаны и апробированы технологии видоспецифичной ДНК-диагностики для выявления описторхид в моллюсках-битиниях и рыбах семейства карповые речных водоемов Гомельщины, позволяющие четко идентифицировать описторхид в исследуемом материале. Установлено, что оптимальными методами выделения геномной ДНК *O. felinus* являются: метод фенольной экстракции, метод с использованием ионно-обменной смолы и СТАВ-метод. Подобраны праймеры для амплификации ITS2 спейсера, позволяющего проводить видовую идентификацию описторхид. Определены параметры ПЦР-анализа, позволяющие получать ампликон ITS2 для видоспецифической идентификации описторха в тканях промежуточных хозяев – моллюсков-битиний и рыбах семейства карповые.

Исследования проводились в рамках темы ГБЦМ 11-32 «Разработка молекулярно-генетических технологий для диагностики возбудителей описторхоза в окончательных и промежуточных хозяевах» (№ 20111158).

Библиографический список

1. King, S. et al. Trematodes of the family Opistorchiidae: a minireview // The Korean Journal of Parasitology. – 2001. – Т. 201. – С. 209–221.
2. Савицкий, Б.П. и др. Природные очаги болезней человека в национальных парках Беларуси. – Минск : Бит «Хата», 2002. – С. 262–267.
3. Акбаев, М.Ш. и др. Паразитология и инвазионные болезни животных : метод. указания /. – М.: МГАВМиБ им. К. И.Скрябина, 2002. – 61 с.
4. Беэр, С.А. Биология возбудителя описторхоза. – М.: Тов-во науч. изд-й КМК, 2005. – 336 с.
5. Ромашов, Б.В. и др. Методика гельминтологических исследований позвоночных животных: учеб. пособие. – Воронеж: ВГУ, 2003. – 35 с.
6. Судариков, В.Е. и др. Метацеркарии трематод – паразиты пресноводных гидробионтов Центральной России; под ред. В.И.Фрезе. – М.: Наука, 2002. – 298 с.
7. Маниатис, Т. и др. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
8. Ризевский, С.В. и др. Молекулярно-генетические особенности личинок трематод семейства Schistosomatidae // Тр. БГУ. – 2008. – Т. 3, Ч. 1. – С. 1–14.
9. Müller, B. et al. PCR diagnosis of infections with different species of Opisthorchiidae using a rapid clean-up procedure for stool samples and specific primers // Parasitol Res. – 2007. – V. 100. – P. 905–909.
10. Müller, B. et al. Sensitive and species-specific detection of *Clonorchis sinensis* by PCR in infected snails and fishes // Parasitol Res. – 2007. – V. 100. – P. 911–914.

11. Ando, K. et al. Nucleotide sequence of mitochondrial CO I and ribosomal ITS II genes of *Opisthorchis viverrini* in northeast Thailand // Southeast Asian J Trop Med Public Health 32 (Suppl 2). – 2001. – P. 17–22.

12. Катохин, А.В. и др. Оценка генетических отличий *Opisthorchis felineus* от *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* по ITS2- и CO1-последовательностям // Доклады Академии наук. - 2008. - Т.421. - № 4. - С. 549–552.

13. Брусенцов, И.И. и др. ДНК-диагностика микст-инвазий *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis* с помощью метода ПЦР // Медицинская паразитология. – 2010. – № 2. – С. 10–13.

УДК 574.583

Мухортова О.В.¹, Сабитова Р.З.²

¹ФГБУН Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти,

²ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

ВЕРТИКАЛЬНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЗООПЛАНКТОНА В ОЗЕРЕ КАНДРЫКУЛЬ (БАШКОРТОСТАН)

Ключевые слова: зоопланктон; видовая структура; ракообразные; коловратки; вертикальное распределение.

Введение. Озеро Кандрыкуль – второй по величине карстовый и пресный водоем в Республике Башкортостан и всем Южном Приуралье [8]. Озеро овальной формы, размерами 8×3,6 км, со средней глубиной 7,2 м (макс. – 16,5 м), оно расположено на в Туймазинском районе, в лесостепной зоне Волжско-Камского бассейна (рис. 1).



Рис. 1. Карта-схема озера Кандрыкуль Республики Башкортостан

Происхождение озера, согласно большинству источников, карстовое. На акватории озера, в его северной части расположен остров Утрау (0,49×0,11 км, площадь 0,045 км²); протока к северу от острова мелководна, а к югу от него дно резко обрывается к области максимальных глубин [8]. Характерной особенностью озера является развитие плотных зарослей погруженных макрофитов. Они покрывают большую часть литоральной зоны озера, визуалью до глубины 5 м.

Целью нашей работы было изучение видового обилия беспозвоночных, и вертикальное распределение зоопланктона в пелагической части озера Кандрыкуль Республики Башкортостан.

Материалы и методы исследования

Исследования зоопланктона озера Кандрыкуль проводились в составе комплексных экспедиций ИЭВБ РАН в период с 24-25 июня и 1-2 сентября 2010 г. Пробы гидробионтов отбирали по стандартным гидробиологическим методикам [6, 7]. В двух пелагических станциях, станция 1 в области максимальной глубины (14,5 м) и станция 2 с глубиной, близкой к средней по озеру (7 - 7,5 м). Отбор проб в пелагиале производили на различных горизонтах батометром, пропуская 4 л воды через мельничный газ № 64. Фиксировали материал 4%-раствором формалина. При определении таксономической принадлежности организмов учитывались не только виды, но и морфы. Для видовой идентификации зоопланктона использовались определители [1, 2, 3, 5, 7, 9].

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований в пелагической части озера Кандрыкуль Республики Башкортостан было зарегистрировано 64 вида зоопланктона. Из них Rotifera – 15 видов (23,5 % от общего числа зарегистрированных видов), Cladocera – 31 (48,4 %), Cyclopoida – 16 (25 %), Calanoida – 2 (3,1 %).

Наибольшим числом видов отличались ракообразные – 49 (76,6 % от общего числа зарегистрированных видов зоопланктона), затем следовали коловратки – 15 видов или 23,5 %.

При определении зоопланктеров в пелагической части регистрировали высокое видовое богатство ракообразных. Из них среди Cladocera отмечалось несколько отдельных видов и межвидовых гибридов. Среди кладоцер выделим представителей рода *Daphnia* (рис. 2). Так как определение данных видов достаточно затруднено из-за межвидовой гибридизации. Мы в своей работе учитывали только четко выделенные виды, указанные в последних определителях по ракообразным [7], так как данная группа еще сильно подвержена морфологическим сезонным изменениям (лето, осень).

Интересно то, что в данном водоеме представлены все виды рода *Acroporus* Baird, 1843. Возможно, в данном роде могут образовываться и переходные формы, для которых (по литературным сообщениям) четких систематических признаков не разработано [10]. Большие проблемы возникали при определении

A. harpa (Baird, 1834), *A. angustatus* Sars, 1863 и *A. negletus* Lilljeborg, 1901. Так как одна из распространенных точек зрения, согласно которой два последних таксона являются синонимами, подвидами или разновидностями первого [5]. Н.Н. Смирнов (1971) в своем определителе придает всем трем таксонам видовой статус [9]. По предварительным данным А.Ю. Синева [10] и последним современным определителям *A. harpa* и *A. angustatus* являются самостоятельными видами, *A. negletus* является синонимом последнего [7].

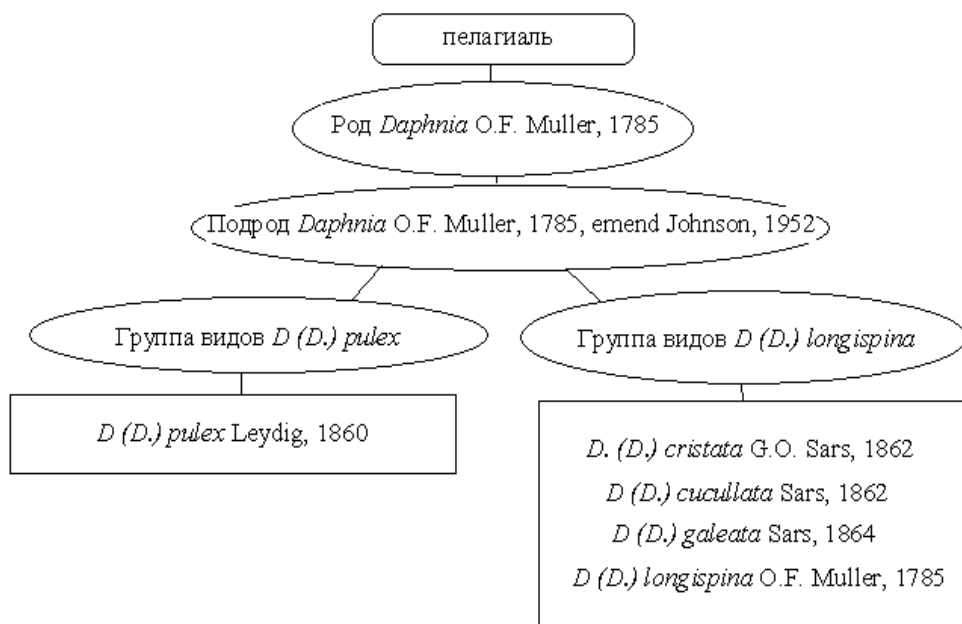


Рис. 2. Систематическое деление рода *Daphnia* в озере Кандрыкуль

Наибольшее количество видов зарегистрировано на глубоководной станции 1. Потому что, было отобрано большее количество (13) проб, отобранных на этой станции с разных горизонтов, в то время как на станции 2 определялся по 1-2, максимально – 4 пробами. В июне на станции 1 было зарегистрировано 30 видов зоопланктов с соотношением таксономических групп Rot:Cl:Сус:Cal = 6:14:9:1. В сентябре было обнаружено только 23 вида беспозвоночных. Соотношение таксономических групп несколько сдвинулось в сторону преобладания копепод: Rot:Cl:Сус:Cal = 3:8:10:2. И в июне, и в сентябре доля коловраток в видовом составе была ниже, чем в среднем по всему озеру: 20 и 13%, соответственно.

Вертикальное распределение количественных показателей (численности и биомассы) зоопланктона в озере Кандрыкуль в пелагической части изменялось от июля к сентябрю. На различных горизонтах численность, биомасса и средние индивидуальные веса организмов пелагической станции 1 показаны на рис. 2. В июне общая численность зоопланктона меняется по вертикали от 8 (9 м) до 100 экз/л (6 м), высока она и в придонном горизонте. Пределы изменения биомассы столь же велики, от 0,107 мг/л на глубине 9 м до 2,2 мг/л в придонном слое. В сентябре эти показатели значительно увеличиваются. Численность изменяется в пределах от 336 до 775 экз/л, а биомасса варьировала более значительно, от 2,1 до 18 мг/л (рис. 3).

По численности на большинстве горизонтов станции 1 в июне доминируют Cyclozoidea (рис. 3). Каланоиды отсутствуют на большинстве горизонтов. Вклад коловраток в численность зоопланктона мал.

По биомассе в эпилимнионе станции 1 в июне также доминировали Cyclozoidea, а в металимнионе, начиная с глубины 9 м – кладоцеры, с доминированием на разных горизонтах *Pleuroxus trigonellus* (O.F. Müller, 1785), *Eurycercus (E.) lamellatus* (O.F. Müller, 1785), *A. angustatus*.

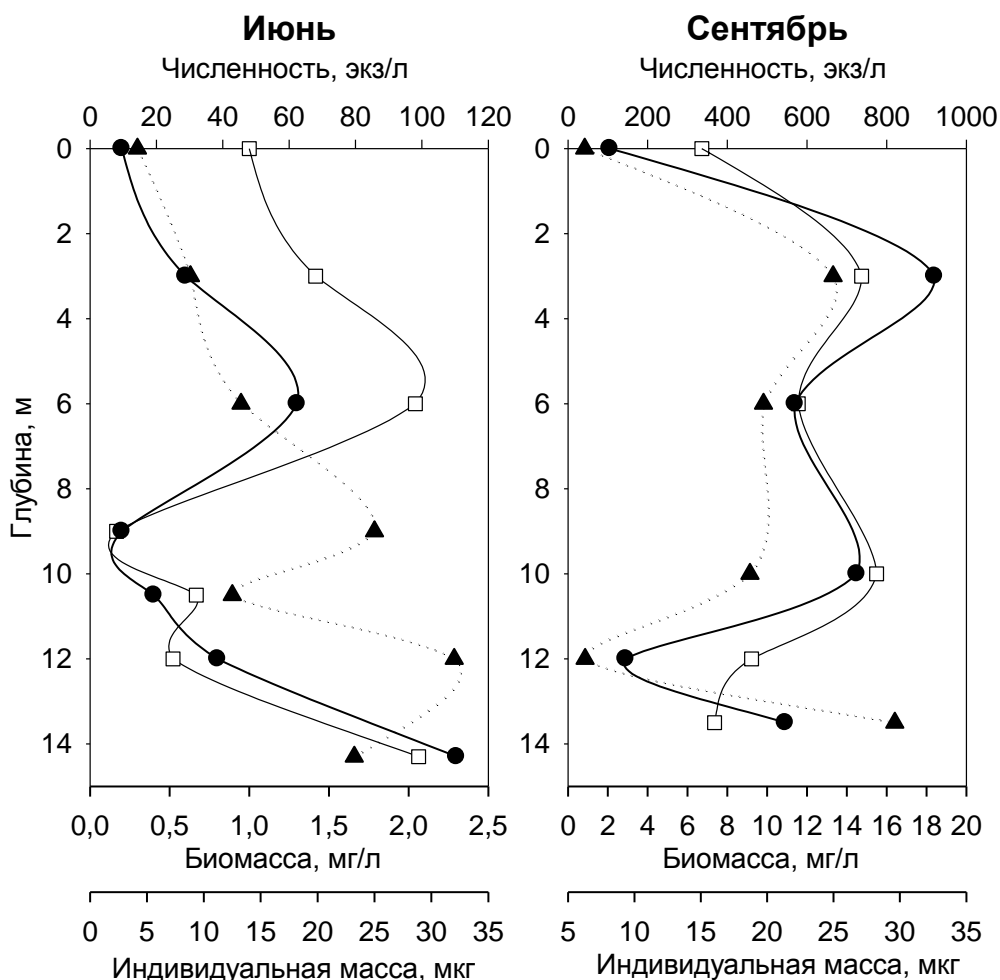


Рис. 3. Показатели численности и биомассы зоопланктона в пелагиали на глубоководной станции по горизонтам озера Кандрыкуль

При изучении вертикального распределения беспозвоночных в сентябре на станции 1 в поверхностных горизонтах кладоцеры продолжают обнаруживаться в заметных количествах и с высокой биомассой, *Diaphanosoma brachyurum* (Lievín, 1848) и *D. cucullata* входят в состав доминирующего комплекса вплоть до горизонта 9 м. (рис. 3, табл. 1). В нижележащих горизонтах преобладают *Eudiaptomus graciloides* (Lilljeborg, 1888) и копеподиты Calanoida (вероятно, этого же вида) (табл. 1). Такое контрастное распределение связано, возможно, со штормовой погодой с момент отбора проб в сентябре, т.к. каланоиды приурочены к гидродинамические стабильным слоям воды, и могут опускаться из области активного турбулентного перемешивания в более стабильные нижележащие горизонты.

Таблица 1 Виды зоопланктона доминирующие в пелагиали озера Кандрыкуль

Горизонт, м	Июнь		Сентябрь	
	Численность	Биомасса	Численность	Биомасса
1	2	3	4	5
Станция 1				
0	<i>Keratella hiemalis</i> Carlin, 1943; <i>A. angustatus</i> ; науплии Cyclopoida; науплии Calanoida	<i>Microcyclops varicans</i> (Sars, 1863); <i>Eucyclops macruroides</i> (Lilljborg, 1901); копеподиты Cyclopoida	<i>D. brachyurum</i> ; науплии Cyclopoida; науплии Calanoida	<i>D. brachyurum</i> ; <i>Microcyclops bicolor</i> (Sars, 1863); <i>E. graciloides</i>
3	<i>D. cucullata</i> ; <i>A. angustatus</i> ; науплии Cyclopoida; науплии Calanoida	<i>D. cucullata</i> ; <i>M. varicans</i> ; копеподиты Cyclopoida; копеподиты Calanoida	<i>D. brachyurum</i> ; <i>D. orghidani</i> (Negrea, 1982); <i>Leptodora kindtii</i> (Focke, 1844); <i>D. cucullata</i> ; науплии Calanoida	<i>D. brachyurum</i> ; <i>D. orghidani</i> ; <i>L. kindtii</i> ; <i>D. cucullata</i> ; копеподиты Cyclopoida; копеподиты Calanoida;
6	<i>Brachionus plicotilis</i> Fadeev, 1925; <i>D. cucullata</i> ; <i>A. angustatus</i> ; <i>A. harpae</i> ; науплии Cyclopoida; копеподиты Cyclopoida	<i>Eucyclops macrurus</i> (Sars, 1863); <i>Megacyclops albidus</i> (Jurine, 1820) ; копеподиты Cyclopoida	<i>D. brachyurum</i> ; <i>D. cucullata</i> ; науплии; копеподиты Cyclopoida; <i>Eudiaptomus gracilis</i> (Sars, 1863); <i>E. graciloides</i>	<i>D. brachyurum</i> ; <i>D. cucullata</i> ; копеподиты Cyclopoida; <i>E. macruroides</i> ; <i>E. graciloides</i>
9	<i>A. harpae</i> <i>E. macruroides</i>	<i>A. harpae</i>	-	-
10,5 (10)	<i>P. trigonellus</i> ; науплии Cyclopoida; копеподиты Cyclopoida	<i>P. trigonellus</i> ; <i>E. lamellatus</i> ; <i>A. angustatus</i> ; <i>A. harpae</i>	<i>D. brachyurum</i> ; <i>D. orghidani</i> ; <i>D. cucullata</i> ; науплии Cyclopoida; копеподиты Cyclopoida	<i>D. brachyurum</i> ; <i>D. orghidani</i> ; <i>D. cucullata</i> ; копеподиты Cyclopoida; <i>E. macrurus</i> ; <i>E. graciloides</i>
12	<i>Mesocyclops leuckarti</i> (Claus, 1857); копеподиты Cyclopoida; копеподиты Calanoida	<i>E. lamellatus</i> ; <i>A. angustatus</i> ; <i>A. harpae</i>	<i>D. brachyurum</i> ; <i>D. orghidani</i> ; копеподиты Cyclopoida; копеподиты Calanoida	копеподиты Calanoida; <i>E. graciloides</i>

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
14,3 (13,5)	<i>Thermocyclops oithonoides</i> (Sars, 1863); <i>M. leuckarti</i> ; <i>A. angustatus</i> ; <i>A. harpae</i>	<i>E. lamellatus</i> ; <i>A. harpae</i> ; <i>T. oithonoides</i> ; <i>M. leuckarti</i>	<i>Bosmina longirostris</i> (O.F. Müller, 1785); науплии Cyclopoida; <i>E. graciloides</i> ; копеподиты Calanoida	<i>E. gracilis</i> ; <i>E. graciloides</i> ; копеподиты Calanoida
Станция 2				
0	<i>P. aduncus</i> ; <i>P. trigonellus</i> ; <i>A. harpae</i> ; науплии Cyclopoida; копеподиты Cyclopoida	<i>P. aduncus</i> ; <i>P. trigonellus</i> ; <i>A. harpae</i> ; <i>D. cucullata</i> ; <i>Paracyclops fimbriatus</i> (Fischer, 1853)	науплии и копеподиты Cyclopoida; науплии Calanoida	Копеподиты Cyclopoida <i>E. graciloides</i>
7,5 (7)	<i>Keratella quadrata</i> (Müller, 1786); <i>D. brachyurum</i> ; <i>Chydorus sphaericus</i> (O. F. Müller, 1785); <i>A. harpae</i>	<i>P. aduncus</i> ; <i>C. sphaericus</i> ; <i>D. brachyurum</i>	науплии Cyclopoida; науплии Calanoida;	копеподиты Cyclopoida; копеподиты Calanoida

На пелагической станции 2 с глубиной 7-7,5 м уже в июне численности и биомассы намного выше, чем на станции 1 (в среднем, соответственно, 675,5 экз/л и 7,15 мг/л). В сентябре эти величины несколько снижаются и становятся близкими к средним значениям по верхним (0-9 м) горизонтам станции 1. В июне на поверхности и придонном слоях по численности и биомассе доминируют кладоцеры (*P. aduncus* (Jurine, 1820) и *D. brachyurum*), а сентября преобладают науплии и копеподиты Cyclopoida, науплии и копеподиты Calanoida (табл. 1).

Оценка трофического состояния водоема [4] в пелагической части озера Кандрыкуль летом 2010 г. по развитию зоопланктона показала, что он находится на границе олиго- и мезотрофии (класс – умеренный или средний), а осенью на границе α - и β -эвтрофии (класс – повышенный или высокий).

Выводы

В пелагической части озера Кандрыкуль Республики Башкортостан было отмечено 64 вида зоопланктона.

Вертикальное распределение численности и биомассы зоопланктона в озере Кандрыкуль в пелагической части изменялось от июля к сентябрю. По численности и биомассе на большинстве горизонтов в июне доминировали представители ракообразных, а вклад коловраток был довольно мал. По биомассе в эпилимнионе в июне преобладали Cyclopoida, а в металимнионе, начиная с глубины 9 м – Cladocera.

В сентябре в поверхностных горизонтах до глубины 9 м преобладали кладоцеры, ниже лидировали копеподиты Calanoida и *E. graciloides*.

Трофического состояния водоема в пелагической части озера Кандрыкуль летом 2010 г. по развитию зоопланктона показала, что он находится на границе олиго- и мезотрофии, а осенью на границе α - и β -эвтрофии.

Благодарности

Авторы выражают благодарность с.н.с. ИЭВБ РАН, к.б.н., М.Ю. Горбунову и с.н.с. ИЭВБ РАН, к.б.н., М.В. Уманской за помощь в математической обработке материала. Авторы искренне признательны сотруднику лаборатории экологии простейших и микроорганизмов ИЭВБ РАН с.н.с., к.б.н., Н.Г. Тарасовой, с.н.с., Т.Н. Бурковой, с.н.с., к.б.н., С.В. Быковой и зав. лаб., д.б.н., В.В. Жарикову за помощь в сборе материала и моральную поддержку.

Библиографический список

1. Боруцкий Е.В., Степанова Л.А., Кос М.С. Определитель Calanoida пресных вод СССР. Л.: Наука, 1991. 504 с.
2. Коровчинский Н.М. Ветвистоусые ракообразные отряда Stenopoda мировой фауны (морфология, систематика, зоогеография). М: Товарищество научных изданий КМК, 2004. 410 с.
3. Кутикова Л.А. Коловратки фауны СССР. Л.: Наука, 1970. 744 с.
4. Китаев С.П. Основы лимнологии для гидробиологов и ихтиологов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 395 с.
5. Мануйлова Е.Ф. Ветвистоусые рачки (Cladocera) фауны СССР. Л.: «Наука», 1964. 327с.
6. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. М., 1975. 240с.
7. Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской части. Т. 1. М: Товарищество научных изданий КМК, 2010. 495 с.
8. Реестр особо охраняемых природных территорий Республики Башкортостан. Уфа: Гилем, 2010. 414 с.
9. Смирнов Н.Н. Macrotycida фауны мира. Т.1. Л.: «Наука», 1971. 553 с.
10. Смирнов Н.Н., Коровчинский Н.М., Котов А.А., Синев А.Ю. Систематика CLADOCERA: современное состояние и перспективы развития. Ветвистоусые ракообразные: систематика и биология // Мат. Всероссийской школы-конференции. ИБВВ им. Папанина. Нижний Новгород: Вектор ТиС. 2007. С. 5-73.

УДК 631.4

Насибуллин Р.И., Киреева Н.А., Григориади А.С.

ФГБОУ ВПО Башкирский государственный университет, г.Уфа

ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА УСКОРЕНИЕ ДЕСТРУКЦИИ НЕФТИ В ВОДОЕМЕ

Ключевые слова: нефть; вода; углеводород окисляющие микроорганизмы; биоремедиация; биопрепарат; восстановление.

Введение. Нефть и нефтепродукты на современном этапе являются основными загрязнителями внутренних водоемов, вод и морей, мирового океана. Они попадают в реки и водоемы вследствие аварийных разливов, утечек из трубопроводов, при аварийном сбросе больших объемов нефтесодержащих сточных вод из временных амбаров, накопителей, отстойников промышленных предприятий и городской канализации [5]. Нефть и нефтепродукты создают разные формы загрязнения: плавающую на воде нефтяную пленку, растворенные или эмульгированные в воде нефтепродукты, осевшие на дно тяжелые фракции. Это затрудняет процессы фотосинтеза в воде из-за прекращения доступа солнечных лучей, а также вызывает гибель растений и животных. При этом изменяется запах, вкус, окраска, поверхностное натяжение, вязкость воды, уменьшается количество кислорода, появляются вредные органические вещества, вода приобретает токсические свойства и представляет угрозу не только для человека. 12 г нефти делают непригодной для употребления тонну воды. Каждая тонна нефти создает нефтяную пленку на площади до 12 кв. км. Восстановление пораженных экосистем занимает 10-15 лет [6].

В настоящее время предложен огромный спектр технологий с применением различных средств для очистки нефтезагрязненных вод. Самыми перспективным из них является очистка с использованием биообъектов. К основным подходам среди биологических методов очистки можно отнести внесение чистых культур нефтеокисляющих микроорганизмов и использование ассоциаций микроорганизмов-деструкторов; активизация аборигенной нефтеокисляющей микробиоты [2].

Целью научно - исследовательской работы являлась оценка эффективности применения биопрепарата Универсал, для различных приемов очистки водных объектов от нефтяных углеводородов.

Объекты и методы исследований

Объектом исследований являлась вода водоемов, расположенных рядом с нефтяным месторождением, искусственно загрязненная разной концентрацией нефти. Рекультивационным фактором служил биопрепарат на основе

природных углеводородокисляющих бактерий *Rodococcus equi* – «Универсал». Образцы анализировали через 3, 30 и 90 суток. Повторность опытов трехкратная.

Биологическая активность загрязненной озерной воды оценивалась по изменению численности углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ). Определение численности микроорганизмов производили общепринятыми методами посева воды на твердые и жидкие питательные среды [4]. Также оценивалась ферментативная активность загрязненных и рекультивируемых вод (дегидрогеназа). Активность дегидрогеназы определялась спектрофотометрическим методом [7]. Динамику изменения биохимического показателя воды оценивали по уровню химического потребления кислорода (ХПК). Химическое потребление кислорода (ХПК) определяли бихроматным методом. Бихромат окисляет при кипячении в сернокислой среде большинство органических веществ, присутствующих в воде, на 95-100%. Избыток бихромата определяют титрованием [1].

Результаты и обсуждения

Для оценки степени восстановления водной экосистемы нами использовался общепринятый для экологического контроля за состоянием водоемов показатель ХПК. Данные свидетельствуют о том, что в процессе биоремедиации происходило постепенное очищение водоема (рис. 1).

Результаты исследований показали, что потребление кислорода при загрязнении 10% и 15% нефтью на 3, 30, 90-е сутки были очень высокими. Это обусловлено большим количеством химических веществ содержащих кислород, входящих в состав нефти. При обработке препаратом величина ХПК постепенно снижается. На 90-е сутки величина ХПК пробы с обработкой препаратом ниже на 40 % по сравнению с пробами без обработки (рис. 1). Это показывает, что нефть активно разлагается за счет роста нефтеокисляющих микроорганизмов препарата Универсал.



Рис.1. Значение ХПК воды загрязненной нефтью и обработанной Универсалом.

Визуально изменилось состояние поверхности водоема. Первоначально нефтяная пленка потеряла маслянистый блеск, затем она коагулировалась, исчез характерный мазутный запах. Однако для оценки степени очистки в большей степени важны биологические показатели, нежели химические, т.к. именно они отражают реальную экологическую ситуацию.

Гетеротрофные микроорганизмы, использующие в качестве источника энергии и углерода органические т. е. углеродсодержащие соединения. Они широко распространены в почве, воде и грунте водоёмов, пищевых продуктах и т.д. При изучении динамики развития гетеротрофных микроорганизмов наблюдались такие закономерности: внесение в озерную воду 10% нефти привело к увеличению их численности, так как нефть является дополнительным источником органических веществ. К концу эксперимента численность данной группы микроорганизмов увеличилась в 2 раза. Такие же результаты были получены в вариантах загрязнения озерной воды 15% нефтью. Внесение препарата привело к увеличению численности гетеротрофных микроорганизмов в 3-4 раза в сравнении с контрольным вариантом опыта.

Внесение нефтяных углеводородов в воду стимулировало рост специфической группы микроорганизмов, отвечающей за деструкцию поллютанта. С увеличением длительности протекания опыта увеличивалась и численность углеводородоокисляющих микроорганизмов. Применение препарата также стимулировало развитие данной группы микроорганизмов. Через 90 суток показатель превышал контрольные значения в 5 раз, а значение в необработанных пробах на 20% (рис.2).

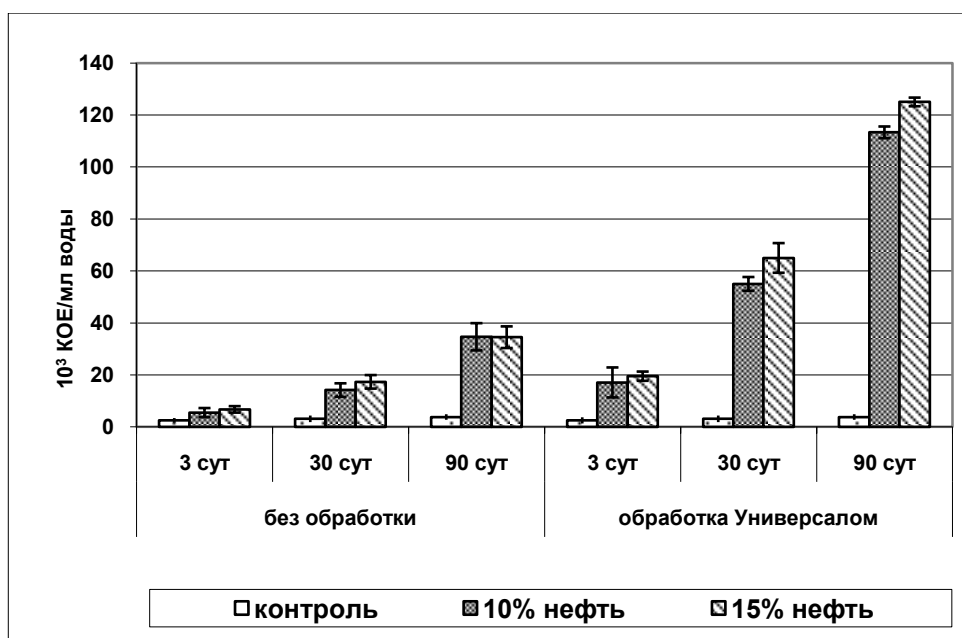


Рис.2. Динамика роста численности углеводород окисляющих микроорганизмов воде загрязненной нефтью и обработанной Универсалом.

Известно, что ни один полный биологический процесс не совершается без участия дегидрогеназ. Эта группа окислительно-восстановительных ферментов

катализирует первые этапы биологического окисления многих органических веществ, в том числе и углеводов. Высокая чувствительность дегидрогеназ к химическим веществам широко используется для оценки токсичности промышленных вод [7].

Внесение 10% нефти в чистую озерную воду на 3-е сутки опыта приводило к увеличению активности фермента, однако при внесении 15 % нефти дегидрогеназная активность озерной воды снизилась в 3 раза по сравнению с контролем. На 30-е сутки уровни активности проб были почти одинаковыми видимо, в результате адаптации микробного сообщества к экстремальным условиям. В конце опыта в пробах внесенных 10% и 15% нефти дегидрогеназная активность озерной воды была ниже чем в контроле (рис. 3).

При обработке препаратом ферментативная активность повышалась. При загрязнении озерной воды 15% нефтью дегидрогеназная активность уменьшалась по сравнению с контрольным вариантом (рис. 3). На 30-е и 90-е сутки в пробах загрязненных 10%, 15% нефтью и обработанных Универсалом дегидрогеназная активность повысилась на 15% и 45% соответственно. Увеличение дегидрогеназной активности говорит том, что активно идут процессы очищения воды.

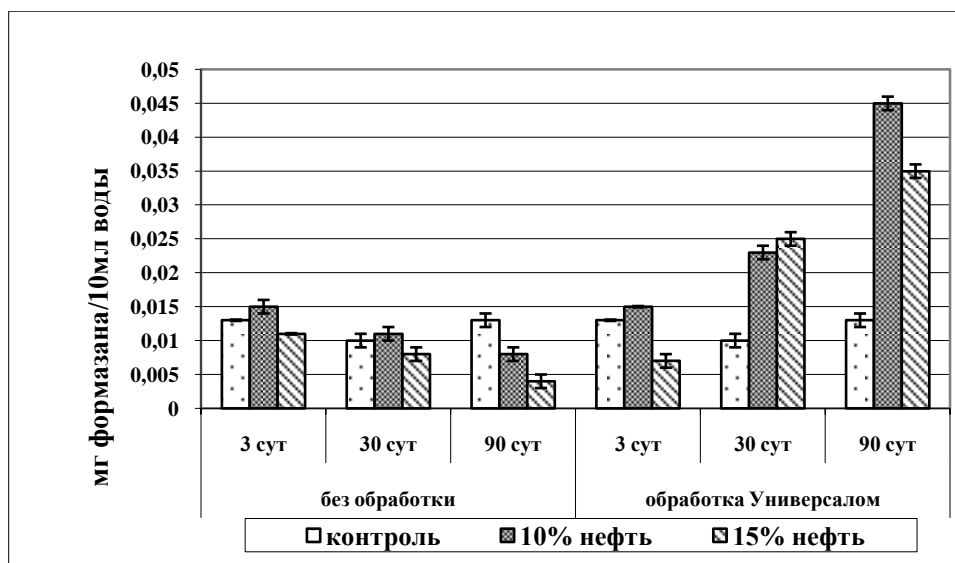


Рис.3. Активность дегидрогеназы в загрязненной нефтью и рекультивируемой Универсалом озерной воде.

В результате исследований было обнаружено, что обработка нефтезагрязненной воды водоема микробным препаратом «Универсал», ускоряет деструкцию нефтяных углеводов. Биопрепарат способствует повышению численности аборигенной микробиоты, способной активно деструктировать компоненты нефти и нефтепродуктов. Кроме того, было показано, что при обработке биопрепаратом активность окислительно-восстановительных ферментов, как один из показателей потенциальной биологической активности, характеризующий способность системы сохранять гомеостаз, повысилась. Показатели ХПК также свидетельствуют о снижении содержания остаточных углеводов в воде.

Библиографический список

1. ГОСТ Р 52708-2007 Вода.
2. Вельков В.В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы // Биотехнология. – 1995. – № 3-4. – С.20-27.
3. Маркарова, М.Ю. Опыт применения биопрепарата "Универсал" для рекультивации нефтезагрязненных земель / М.Ю. Маркарова // www.ib.komisc.r/t/ru/ic/vt/04-84/06.html – Вест. Института Биологии Коми НЦТ УрО РАН. 2004. №84.
4. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцев. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
5. Квасников Е.М., Ключникова Т.М. Микроорганизмы – деструкторы нефти в водных бассейнах. - Киев: Наукова думка, 1981. -131 с.
6. Одум Е.Р. Экология. - М.: Мир, 1986. - Т. 2. - 376 с.
7. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука, 2005. – 252 с.

УДК 581.1:577.214.625:578.853

Сафиуллина М.Г., Кулуев Б.Р.

ФГБОУ ВПО БГПУ им. М.Акмоллы

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЭКСПАНСИНЫ

Ключевые есть: экспансины; трансгенные линии; экспрессия генов.

Во многих морфогенетических процессах, таких как созревание плода, прорастание пыльцевой трубки, рост корневых волосков, опадение листьев принимают участие экспансины, способные индуцировать растяжение клеточных стенок. Экспансины – это внеклеточные белки, обеспечивающие растяжение клеточной стенки, путем разрыва водородных связей между ксилогликанами и целлюлозными микрофибриллами. Предполагается, что изменяя экспрессию генов экспансинов, можно регулировать процессы клеточного деления и растяжения, и, соответственно, размеры вегетативных органов растений. С целью изучения влияния повышенной экспрессии экспансинов на величину органов растений, нами были получены трансгенные растения табака с генами *AtEXPA10 Arabidopsis thaliana*, *PnEXPA1*, *PnEXPA3 Populus nigra* L., *NtEXP5 Nicotina tabacum* L. под контролем 35S промотора.

Трансгенные формы табака (*Nicotiana tabacum* L. Petit Havana SR-1) получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков. Первичные трансгенные T₀-побеги отбирали на селективной среде (соли среды МС с добавлением 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л НУК), содержащей 25 мг/л гигромицина (Нуг). Качественную оценку активности репортерного гена *GUS* в листьях T₀-побегов опереждали гистохимически, используя субстрат X-Gluc (натриевая соль 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-глюкуроновой кислоты Fermentas).

В результате проведенных исследований нами было показано осязаемое влияние повышенной экспрессии целевых генов на размеры вегетативных органов растения. Трансгенные линии, в первую очередь, характеризовались увеличенным размером клеток эпидермиса и мезофилла листьев, удлиненными стеблями и измененным количеством цветков.

Сверхэкспрессия генов *AtEXPA10* и *PnEXPA1* способствовали увеличению всех вегетативных органов: листовых пластинок, черешков листьев, стеблей, количества и площади клеток. Например, длина листьев опытных растений превышала контрольные линии на 40-60%, площадь клеток отличалась на 20-50%, размер цветков остался прежним, однако увеличилось их количество. Это говорит о том, что эти гены могут быть использованы для создания трансгенных растений с увеличенными размерами листьев.

Ген *NtEXPA5* на размеры листьев табака влиял в меньшей степени, но способствовал увеличению длины стебля на 24-46%, остальные морфологические параметры трансгенных растений остались практически неизменными. Повышенная экспрессия гена *PnEXPA3* увеличивала длину стебля на 16% и площадь клеток на 60%, но размеры листьев у анализируемых растений остались в пределах нормы. Таким образом, гены *NtEXPA5* и *PnEXPA3* могут использоваться для создания растений с удлиненными стеблями. Однако применение этих генов ограничивается компенсаторными механизмами в самих растениях, которые направлены на поддержание гомеостаза, в связи с чем существует необходимость поиска и исследования генов и других экспансинов, а также в использовании индуцибельных или тканеспецифичных промоторов с целью преодоления негативного влияния высокого уровня экспрессии целевого гена на начальных стадиях развития растения.

УДК 579.253

Тыщенко В.И., Новикова О.Б., Борисенкова А.Н., Белаш Д.Э., Терлецкий В.П.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ДРИМ (ДВОЙНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ И ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ МЕЧЕНИЕ)

Ключевые слова: *генотипирование, бактериальные изоляты, патогены, сальмонелла, протей, эндонуклеазы рестрикции.*

Введение. Разработка методов быстрой идентификации бактериальных штаммов приобретает в настоящее время особую актуальность [2;3]. Это связано циркулированием возбудителей во внешней среде и периодическими эндемическими вспышками заболеваний [4]. В птицеводстве инфекционные заболевания, прежде всего сальмонеллез несут особую угрозу [5], так как на птицефабриках птица находится в условиях, благоприятствующих передаче микроорганизмов между особями (скученность содержания, запыленность помещений и т.д.). Для надежной идентификации и паспортизации

бактериальных штаммов необходимо применение современных методик генотипирования [1]. Генотипирование позволяет присвоить молекулярно-генетический «штрих-код» каждому штамму, проследить пути передачи и выявить источники инфекции. В случае если два изолята, выделенные из разных мест, будут иметь идентичный генотип, можно с высокой степенью уверенности говорить об эпизоотическом контакте. Помимо этого, паспортизация важна при хранении коллекций штаммов, в том числе вакцинных, в лабораторных условиях. Идентичность генотипа микроорганизма, выделенного из особи до и после проведения лечебных мероприятий, свидетельствует о неэффективности последних. В то же время, если выявлен другой генотип – это является прямым доказательством успешности лечения, направленного на борьбу с возбудителем выявленного штамма и последующего заражения другим штаммом.

Существует множество методов типирования микроорганизмов. В настоящее время однозначно доказано, что методы, основанные на полиморфизме геномной ДНК (генотипирование), являются наиболее чувствительными и воспроизводимыми [8].

На сегодня самым точным методом генотипирования является метод ДРИМ (двойное расщепление и избирательное мечение), который впервые был разработан для клинических изолятов патогенных микроорганизмов - *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella spp.* [9;10]. Результатом генотипирования методом ДРИМ является группа фрагментов ДНК в виде полос на фильтре, распределение которых специфично для каждого штамма или близкородственной группы штаммов. Точность идентификации штаммов, рассчитываемая по индексу дискриминации [7] превышает точность текущего «золотого стандарта» генотипирования пульс-гель электрофореза [10]) и достигает для псевдомонад 0,98, сальмонелл – 0,96.

Цель данной работы состояла в выяснении соответствия данных генотипирования микроорганизмов (метод ДРИМ) и эпизоотологических данных (время, место взятия образца). Данный метод генотипирования впервые испытывается на бактериальных изолятах, выделенных на территории РФ либо сопредельных стран.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования служили 9 бактериальных изолятов сальмонелл (*S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium*) и 8 изолятов протей (*P. vulgaris* и *P. mirabilis*), выделенных в ГНУ ВНИВИП (Санкт-Петербург-Ломоносов) из тканей или помета птиц. Экстракцию геномной ДНК проводили традиционным способом с применением фенольно-хлороформной экстракции. Полученную ДНК промывали 70% этанолом, подсушивали и растворяли в буфере TE (10 мМ трис-HCL, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0).

Метод ДРИМ основан на одновременном расщеплении геномной ДНК микроорганизма двумя рестрикционными эндонуклеазами и избирательном мечении отдельных фрагментов ДНК. Преимуществом метода является быстрота (8 часов в сравнении с 3 сутками в методе пульс-гель электрофорез), высокая точность и отсутствие ПЦР этапа. В связи с тем, что у многих видов

микроорганизмов геном к настоящему времени полностью секвенирован, т.е. определена последовательность нуклеотидов в геномной ДНК, есть возможность теоретически предсказывать количество фрагментов ДНК, получаемых при расщеплении каждой из рестриктаз, а также после двойного расщепления одновременно двумя рестриктазами. Для этого мы используем доступную в интернете программу (<http://insilico.ehu.es/DDSL>). Программа была разработана исследователями из Испании [6], которые также участвовали в разработке метода ДРИМ для клинически важных видов патогенных бактерий в рамках совместных грантов НАТО-Россия.

Поиск *in-silico* выявил, что лучшей крупнощепящей рестриктазой для протеев является *SgsI*, имеющей сайт узнавания и расщепления GG↓CGCGCC. Данный фермент имеет несколько десятков сайтов расщепления в геноме протеев и производит «липкие» концы, которые метятся биотинилированным дезоксицитозинном (Bio-dCTP) с помощью Taq-полимеразы [9;10]. Получаемые фрагменты ДНК не могут быть разделены в обычном агарозном геле, так как являются слишком крупными. Поэтому, в реакцию вводили мелкощепящую рестриктазу *Eco32I*, имеющую около тысячи сайтов расщепления и узнающую последовательность GAT↓ATC. В результате такого двойного расщепления размер фрагментов ДНК является оптимальным для разделения в агарозном геле. Таким образом, в реакционной смеси присутствует ограниченное число меченых фрагментов ДНК, которые могут быть разделены и визуализированы. Выполнение генотипирования сальмонелл проводили аналогичным способом за исключением подбора других ферментов рестрикции: крупнощепящая рестриктаза *XbaI* и мелкощепящая рестриктаза *PstI*. Особенностью мелкощепящих рестриктаз является то, что получаемые фрагменты ДНК имеют либо тупые, либо 3'-выступающие концы, которые не могут включить Bio-dCTP.

Двойное расщепление и избирательное мечение (ДРИМ) сводится к внесению в микропробирку 15 мкл воды, 2 мкл 10-кратного буфера R (Fermentas™), 2 мкл выделенной геномной ДНК и 1 мкл ферментной смеси (две рестриктазы, Taq-полимераза и метка Bio-dCTP). Инкубация проводится в течение 2-3 часов при 37°C. Электрофорез проводили в 0,8% агарозном геле. Перенос разделенных фрагментов ДНК на нейлоновый фильтр осуществляли немедленно после электрофореза в дистиллированной воде на вакуумном приборе (денатурация и нейтрализация ДНК не требуется). Детекция фрагментов ДНК на фильтре проводится с помощью обычной цветной химической реакции, основанной на выявлении щелочной фосфатазы.

Результаты исследования. Разработанный нами метод ДРИМ позволяет идентифицировать одновременно около 35 фрагментов ДНК, что является рекордным показателем для методов генотипирования (RAPD – 5-10 фрагментов, пульс-гель электрофорез – 15-20 фрагментов). При накоплении достаточного числа мутаций в штаммах любой метод генотипирования начинает дискриминировать штаммы, причем, чем большее число фрагментов ДНК учитывается в анализе, тем более чувствительным становится данный метод. В отдельных случаях штаммы не отличались по распределению

фрагментов ДНК на фильтре, что свидетельствует о генетической близости этих штаммов. Вероятно, они являются генетически идентичными, либо отличаются друг от друга на уровне всего одного или нескольких генов, полиморфизм которых ускользает при скрининге.

Генотипирование методом ДРИМ геномной ДНК бактерий выявило идентичность трех изолятов сальмонеллы галлинарум (*S. gallinarum*) - 2Sg, 3Sg и 4Sg и сальмонеллы энтеритидис (*S. enteritidis*) – 1Se и 3Se (таблица 1). Среди 8 изолятов *Proteus* два оказались идентичными (изоляты 6 и 7).

Таблица 1 Генотипирование изолятов *Salmonella spp.* и *Proteus* методом ДРИМ (двойное расщепление и избирательное мечение).

<i>Salmonella spp.</i> (<i>XbaI/PstI</i>)		<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i> (<i>SgsI/Eco32I</i>)	
№ изолята*	генотип	№ изолята*	генотип
1S.t.	1	1Pv	1
1S.g.	2	2Pm	2
2S.g., 3S.g., 4S.g.	3	5Pv	3
1S.e., 3S.e.	4	6Pv, 7Pv	4
4S.e.	5	8Pv	5
5S.e.	6	11Pm	6
		12Pv	7

* St – *S. typhimurium*, Sg – *S. gallinarum*, Se – *S. enteritidis*

* Pv – *P. vulgaris*, Pm – *P. mirabilis*

Данные генотипирования методом ДРИМ хорошо согласуются с эпизоотологическими данными (место, время взятия образцов). В частности, изоляты *S. gallinarum* были выращены из тканей больных кур, находившихся в контакте в одном хозяйстве (Узбекистан). Идентичность генотипа сальмонелл свидетельствует о заражении кур друг от друга одним и тем же штаммом патогена. Бактериальные культуры *S. gallinarum* выращивались из разных органов пораженных кур: 2S – сердце, февраль 2009 г., 3S – печень, февраль 2009 г., 4S – яичные фолликулы, февраль 2009 г. Генотипирование сальмонеллы энтеритидис выявило идентичность изолятов, выделенных от бройлера в Белгородской области (2012 г.) и особи в хозяйстве Ленинградской области (2006 г.). Это указывает на возможную передачу возбудителя между этими хозяйствами посредством какого-либо контакта.

Изоляты протея по данным генотипирования представляли из себя отдельные отличающиеся штаммы. Исключение составляют изоляты 6 и 7. Данные культуры были выращены из помета перепелок в птицеводческом хозяйстве Ленинградской области в 2010 и 2011 годах. Все остальные образцы были взяты из других мест.

Следующий этап работы подразумевал количественную оценку различий между бактериальными штаммами. Для достижения этого были подсчитаны

количество общих и отличающихся фрагментов ДНК на картинах ДРИМ (таблица 2). Штамм 1S.t. (*Salmonella typhimurium*) значительно отличался от остальных штаммов. В то же время, штаммы *Salmonella gallinarum* и *Salmonella enteritidis* отличались друг от друга в меньшей степени.

Таблица 2 Различия между изолятами *Salmonella typhimurium* (изолят 1S.t.), *Salmonella gallinarum* (изоляты 1S.g.-4S.g.) и *Salmonella enteritidis* (изоляты 1S.e., 3S.e.-5S.e.) по числу отличающихся фрагментов при генотипировании методом ДРИМ

	1S.t.	1S.g.	2S.g.	3S.g.	4S.g.	1S.e.	3S.e.	4S.e.	5S.e.
1S.t.	0	36	34	34	34	33	33	33	41
1S.g.		0	13	13	13	14	14	14	35
2S.g.			0	0	0	14	14	14	32
3S.g.				0	0	14	14	14	32
4S.g.					0	14	14	14	32
1S.e.						0	0	0	22
3S.e.							0	0	22
4S.e.								0	22
5S.e.									0

Аналогичный подсчет числа общих и отличающихся фрагментов ДНК у изолятов *Proteus* (кроме образца 2) выявил генетическую удаленность изолята 11 (*P.mirabilis*) от остальных изолятов (*P.vulgaris*). Количество отличающихся фрагментов ДНК составило от 40 до 47. Изоляты *P.vulgaris* отличались друг от друга на 1-11 фрагментов. Изоляты 6 и 7 не имели отличий по фрагментам ДНК, т.е. были генетически идентичными (таблица 3).

Таблица 3 Различия между изолятами *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* по числу отличающихся фрагментов при генотипировании методом ДРИМ (изолят 2 отсутствует)

№ изолята	1P.v.	5P.v.	6P.v.	7P.v.	8P.v.	11P.m.	12P.v.
1P.v.	0	5	1	1	8	40	10
5P.v.		0	3	3	7	45	10
6P.v.			0	0	11	40	11
7P.v.				0	11	40	11
8P.v.					0	45	7
11P.m.						0	47
12P.v.							0

Данные по числу отличающихся фрагментов ДНК позволяют построить древо генетических взаимоотношений (UPMGA) между изолятами *Proteus* (рисунок 1).

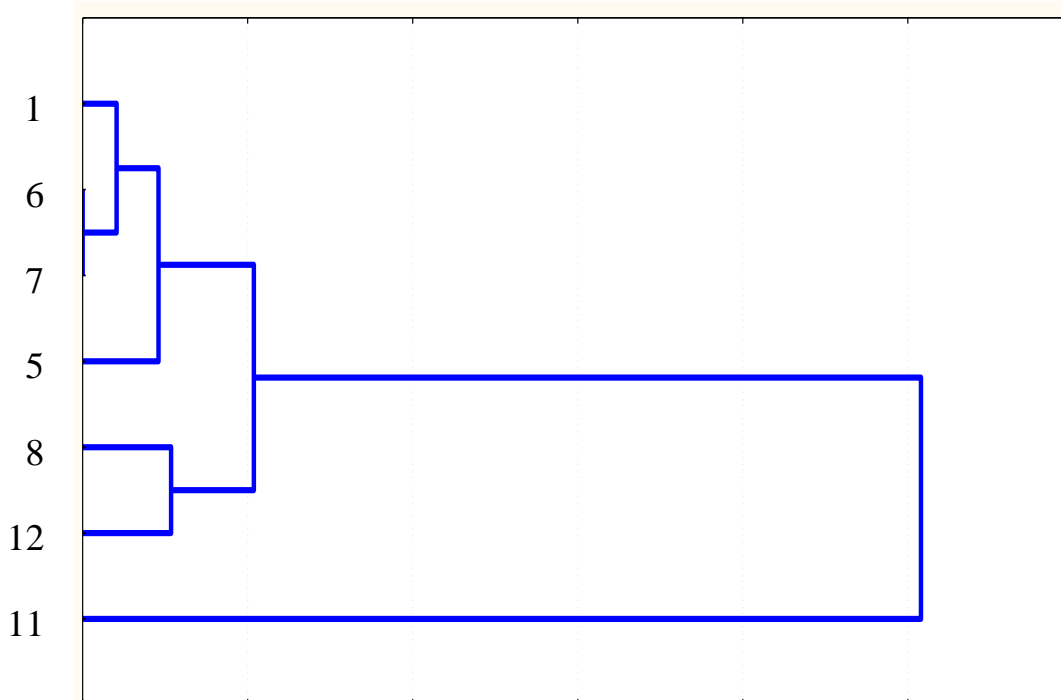


Рисунок 1. Дендрограмма генетических взаимоотношений в группе бактериальных штаммов *Proteus vulgaris* (1,5,6,7,8,12) и *Proteus mirabilis* (11)

Выводы. Метод ДРИМ позволяет идентифицировать отдельные штаммы и группы близкородственных штаммов микроорганизмов родов *Salmonella* и *Proteus*. Метод можно эффективно использовать при нахождении источника инфекции и выявлении путей распространения бактериального патогена во внешней среде.

Библиографический список

1. Ботина С.Г. Молекулярно-генетическая идентификация, ДНК-генотипирование и паспортизация молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* // Доклады на V Съезде генетиков и селекционеров. Москва. 2009. С. 49.
2. Жебрун А.Б., Мукомолов С.А., Нарвская О.В. Генотипирование и субтипирование патогенных микроорганизмов в развитии технологий эпидемиологического надзора // Медицинский академический журнал. 2009. №4. С. 59-67.
3. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Фенотипическое и молекулярно-генетическое типирование сальмонелл: реалии и перспективы // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005. №6. С.88-93.
4. Добрина М. Н. Нужен постоянный контроль сальмонеллеза // Животноводство России. 2011. №3. С. 11-13.
5. Борисенкова А. Н., Новикова О. Б., Байбарак М. Н., Варюхин А. В. Эффективность препаратов разных классов для контроля сальмонеллы

энтеритидис // Материалы XVI конференции «Достижения в современном птицеводстве: исследования и инновации». Сергиев Посад, 2009. С. 344-347.

6. Bikandi, J., R. San Millón, A. Rementeria, and J. Garaizar. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction // *Bioinformatics*. 2004. Vol.22. P. 798-799.

7. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity // *J. Clin. Microbiol.* 1988. Vol.26. P.2465-2466.

8. Lukinmaa, S., U-M. Nakari, M. Eklund, and A. Siitonen. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens // *APMIS*. 2004. Vol.112. P.908-929.

9. Terletskiy V., Kuhn G., Francioli P., Blanc D. Application and evaluation of double digest selective label (DDSL) typing technique for *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates // *J. Microbiol. Methods*. 2008. Vol.72. P. 283-287.

10. Terletskiy V., Tyshchenko V., Martinez-Ballesteros I. et al. Validation of Double Digest Selective Label database for sequenced prokaryotic genomes // *Bioinformatics*. 2010. Vol.26. P.417-418.

УДК 578:633

Уразбахтина Д.Р., Хайруллин Р.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПУТЕЙ БЕЗОПАСНОЙ РЕГУЛЯЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ К ТОКСИНАМ ГРИБОВ Р. *FUSARIUM* У ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ

Ключевые слова: *Fusarium*, злаковые, эндофитные штаммы.

Токсигенные грибы рода *Fusarium* загрязняют зерно, корма и продукты питания опасными фузариотоксинами. По данным ФАО, в мире микотоксинами загрязнено около 25% зерна. Одним из кардинальных путей снижения уровня микотоксинов в зерне считается химическая защита растений. Однако, она эффективна только в случае 100% уничтожения грибов рода *Fusarium*, что является недостижимым, поскольку в популяции фузариевых грибов всегда возникают формы, резистентные к фунгицидам. В этих условиях фунгициды сами стимулируют синтез микотоксинов. В связи с этим актуальной задачей является разработка безопасных способов борьбы с фузариевыми грибами.

В настоящем исследовании проведен скрининг 23 эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* по антагонистической активности к фузариевым грибам, выделенных из зерна озимой ржи. В Республике Башкортостан наиболее часто встречающимися в зерне пшеницы видами являются *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. avenaceum* и *F. graminearum*. Ранее нами были охарактеризованы

взаимоотношения некоторых эндофитных штаммов *B. subtilis* с грибами р. *Fusarium*, выделенными из зерна яровой пшеницы. В результате штамм 11РН был выделен как один из самых антагонистичных к этим фитопатогенам. В данном эксперименте наиболее сильный антагонизм проявили штаммы 49РН, 89РН и 11РН. Полученные результаты подтверждают правильность нашего выбора представителей *B. subtilis* как наиболее активных и перспективных бактерий для регуляции численности популяции фузариевых грибов, поражающих зерно озимой ржи и загрязняющих его опасными микотоксинами.

Так, эндофитные штаммы *Bacillus subtilis* 11РН, 49РН, 89РН были выбраны нами в качестве основы экспериментальных биофунгицидов в связи с их высокой антагонистической активностью. Посевы ржи 2011 г. весной обрабатывали химическим фунгицидом фундазол, осенью – фоликур, а также экспериментальными биопрепаратами. Площадь делянок 10 кв.м. Растения опрыскивали в фазу кущения и колошения. Затем при полном созревании зерна отбирали образцы семян и анализировали их на наличие фузариозной инфекции.

Так, при анализе полученных образцов семян зараженность фузариозной инфекцией в контрольных образцах зерна составляла 10%. Обработка семян препаратом фундазол в среднем снижала распространение фузариоза зерна на 30% (зараженность составляла 7%). Действующим веществом является беномил – один из первых системных фунгицидов широкого использования. Данный фунгицид имеет широкий спектр активности. К нему чувствительны в том числе и дейтеромицеты (*Fusarium*). Опрыскивание посевов препаратом фоликур (рекомендуется для защиты колоса от фузариозной инфекции) в фазу колошения снижала распространение фузариоза зерна в среднем также на 30%. Обработка семян спорами *B. subtilis* 11РН и 49РН снижала заражённость ржи на 60% (зараженность составляла 4%), одинаково, как в образцах с обработкой растений в фазу кущения, так и в варианте с дополнительной обработкой колоса. Обработка штаммом *B. subtilis* 89РН оказалась не эффективной, как в случае с предпосевной обработкой семян, так и в случае опрыскивания растений в фазу колошения. Многими авторами также было показано, что именно эндофитные бактерии р. *Bacillus* эффективны в способности подавлять микрофлору фитопатогенных грибов, в том числе и фузариевых.

Таким образом, можно сделать вывод о перспективности применения данных штаммов как основы биопрепаратов для биоконтроля популяций фузариевых грибов. Использование в качестве основы таких препаратов бактерий, обладающих полезными свойствами, позволяет с одной стороны повышать урожайность сельскохозяйственных культур, с другой – до минимума снижать негативное воздействие препарата на окружающую среду. Так, однократная обработка семян сельскохозяйственных культур препаратами на основе штаммов бактерий р. *Bacillus* позволяет не только защищать растения от фитопатогенных грибов весь период вегетации, но и снижать содержание микотоксинов как в растениеводческой, так и животноводческой продукции за счет деструкции микотоксинов специфическими бактериальными ферментами, в том числе и при скармливании полученного зерна и соломы животным.

Создание таких препаратов стало возможным благодаря выявлению новых эндофитных штаммов бактерий и открытию у них новых свойств.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ №11-04-97044-р_поволжье_а.

УДК 577.152.3: 582.284

Шпирная И.А., Мещерякова Е.С., Цветков В.О., Бережнева З.А.,
Ибрагимов Р.И.

ФГБОУ Башкирский ГУ, г. Уфа, Россия

ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ В ПЛОДОВЫХ ТЕЛАХ ГРИБОВ КЛАССА BASIDIOMYCETES

Ключевые слова: базидиомицет; белок; гидролитический фермент; протеаза; целлюлаза; пектиназа; амилаза

Одним из приоритетных направлений развития современной микологии и биотехнологии является разработка технологий с использованием базидиальных грибов для получения биологически активных соединений, в том числе соединений, обладающих лечебными свойствами. В настоящее время широко используются ферментные препараты, полученные в ходе культивирования микроскопических грибов. Однако существует и ряд проблем при использовании их в качестве продуцентов различных соединений, например риск развития различного рода заболеваний у работников производства, а также определенные технические сложности в процессе культивирования [1].

Базидиальные грибы являются продуцентами целого ряда биологически активных веществ: белков, липидов, полисахаридов, органических кислот, ферментов, витаминов и др. [2]. Высшие грибы, могут служить источником ферментов как пищевого, так и медицинского назначения. Преимуществами этих грибов при искусственном культивировании могут являться - пригодность некоторых из них для употребления в пищу и отсутствие спороношения в культуре, что уменьшает опасность профессиональных заболеваний в условиях производства [1,2].

В связи с вышесказанным, исследование активности ферментов у высших грибов представляет научный и практический интерес.

Целью данной работы является определение уровня активности гидролитических ферментов (протеаз, целлюлаз, амилаз и пектиназ) в плодовых телах высших базидиальных грибов.

Методика

Объектом исследования служили плодовые тела базидиомицетов, собранные в сентябре-октябре в Иглинском районе Республики Башкортостан, отбирали образцы грибов, принадлежащих к различным семействам,

находящиеся в фазе роста, средних размеров, без червоточин, плотной консистенции, образцы замораживали сразу после сбора.

Для получения экстрактов с ферментативной активностью навеску замороженных плодовых тел растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком, экстрагировали дистиллированной водой (1:1). Выдерживали 1,5 часа при 4⁰С, фильтровали и дважды центрифугировали при 10000 об/мин на центрифуге МРW-310 (Польша) в течение 10 мин. далее использовали супернатант.

Для определения концентрации водорастворимого белка в растворах использовали метод М. Бредфорд. Калибровочную кривую для определения концентрации белка строили по α -химотрипсину.

Для измерения активности гидролитических ферментов использовали метод агарозных пластин [3] для определения активности протеиназ в качестве субстрата использовали желатин; амилаз - крахмал; целлюлаз – карбоксиметилцеллюлозу; пектиназ – яблочный пектин, концентрация субстратов в геле составляла 1%. Пластины выдерживали во влажной камере в течение 18 ч при температуре 25⁰С. Пластины проявляли согласно методике. Активность фермента рассчитывали, измеряя размер участка геля с гидролизированным субстратом вокруг лунки. За 1 миллиединицу активности (МЕ) фермента принимали такое количество фермента, которое гидролизовало субстрат на участке геля размером 1 мм².

Эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. В качестве величины погрешности использовали доверительный интервал выборочного среднего.

Результаты и обсуждение

Из культур базидиомицетов выделено, очищено и охарактеризовано более сотни ферментных препаратов, но поиск новых видов грибов – продуцентов разнообразных ферментов, остается актуальным [2].

Для исследований были выбраны грибы, относящиеся к классу базидиомицетов широко распространенные в Республике Башкортостан (табл.1.).

Известно, что биологическая ценность белков микробной и грибной биомассы может превышать ценность белков злаковых и бобовых культур. Перспективным направлением получения белка является использование для этой цели грибной биомассы [4].

Определяли зависимость содержания водорастворимого белка от видовой принадлежности грибов (табл.2).

В целом, все исследованные образцы характеризуются достаточно высоким содержанием белка. Как видно (табл. 2.) наибольшее количество водорастворимого белка на грамм сырой массы содержится в плодовых телах мухомора и трутовика лакированного, что может быть связано с наличием меньшего количества воды в их плодовых телах. Также высокое содержание белка отмечено в плодовых телах шампиньона и груздя. Приведенные

результаты подтверждают данные о грибах как о ценном источнике пищевого белка.

Таблица 1 Видовая принадлежность грибов - базидиомицетов

№	Образец	Латинское название	Семейство
1	Масленок обыкновенный	<i>Suillus luteus</i>	<i>Suillaceae</i>
2	Рыжик настоящий	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Russulaceae</i>
3	Сыроежка красная	<i>Russuia rubra</i>	
4	Груздь настоящий	<i>Lactarius resimus</i>	
	Говорушка рыжая	<i>Clitocybe geotropa</i>	
6	Говорушка серая	<i>Clitocybe nebularis</i>	
7	Трутовик лакированный	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Ganodermaceae</i>
8	Шампиньон полевой	<i>Agaricus arvensis</i>	<i>Agariceae</i>
9	Мухомор красный	<i>Amanita muscaria</i>	<i>Amanitaceae</i>
10	Подберезовик обыкновенный	<i>Leccinum scabrum</i>	<i>Boletaceae</i>
11	Опенок осенний	<i>Suillus luteus</i>	<i>Tricholomataceae</i>

Ферменты грибов разнообразны как по своему происхождению, так и по активности. Среди них особую роль играют гидролитические ферменты в связи со специфическим (осмотрофным) типом питания грибов [5].

Таблица 2 Содержание водорастворимого белка в плодовых телах представителей *Basidiomycetes*

№	Образец	Содержание белка, мг/г сырой массы
1	Масленок обыкновенный	1,75 ±0,07
2	Рыжик настоящий	2,01 ±0,09
3	Сыроежка красная	2,20±0,017
4	Груздь настоящий	3,05±0,02
5	Говорушка рыжая	1,50±0,07
6	Говорушка серая	1,45±0,017
7	Трутовик лакированный	3,05±0,07
8	Шампиньон полевой	3,05±0,09
9	Мухомор красный	4,02±0,05
10	Подберезовик обыкновенный	1,50±0,03
11	Опенок осенний	1,35±0,09

Далее исследовали активность ферментов - гидролаз, играющих основную роль в расщеплении пищевых субстратов грибов (протеазы, карбогидразы). Как показали наши исследования (табл. 3.) все образцы характеризуются высокой протеолитической активностью. Вероятно, это связано с тем, что протеазы выполняют разнообразные физиологические

функции в живом организме, начиная от переваривания белков пищевого субстрата до специфических регуляторных процессов, таких как активация зимогенов, образование гормонов и других физиологически активных пептидов из их предшественников, транспорт белков, защитные реакции и др. [6,7]. Наибольшей протеолитической активностью обладали экстракты плодовых тел масленка и подберезовика, которая составила 9,74 и 11,01 Е/г массы соответственно. Экстракты плодовых тел груздя и шампиньона обладали наименьшей активностью протеаз среди исследованных образцов.

Таблица 3 Активность гидролаз в экстрактах плодовых тел базидиомицетов, Е/г сырой массы

Образец	целлюлаза	амилаза	протеаза	пектиназа
Масленок обыкновенный	3,17±0,49	0	9,7±1,02	4,96±0,38
Рыжик настоящий	5,19±0,44	0	7,42±0,45	4,53±0,35
Сыроежка красная	4,32±0,40	0	6,60±0,71	6,13±0,48
Груздь настоящий	3,92±0,54	0	3,54±0,37	4,74±0,60
Говорушка рыжая	6,13±0,48	0	7,97±0,90	3,73±0,32
Говорушка серая	4,50±0,35	0	3,35±0,58	4,10±0,35
Трутовик лакированный	3,54±0,37	3,54±0,82	8,25±0,56	4,12±0,64
Шампиньон полевой	6,13±0,87	0	2,83±0,33	3,10±0,49
Мухомор красный	4,70±0,60	0	6,65±0,71	4,12±0,35
Подберезовик обыкновенный	3,93±0,54	0	11,01±0,55	5,41±0,38
Опенок осенний	3,53±0,47	0	5,71±0,53	4,36±0,53

Целлюлазы активно разрушают субстрат, на котором произрастают грибы в природных условиях. В целом, целлюлолитическая активность характерна для всех исследованных образцов, наибольшая активность выявлена в плодовых телах шампиньона и говорушки рыжей. Экстракты масленка, груздя и подберезовика обладали наименьшей активностью данных ферментов (табл.3).

Как было выяснено, наибольшей пектиназной активностью обладали плодовые тела сыроежки и подберезовика, а наименьшей – шампиньона и говорушки. Таким образом, грибы, относящиеся к экологической группе микоризных сапротрофов (сыроежка, подберезовик) при сравнении с группой так называемых подстилочных сапротрофов (шампиньон, говорушка) обладают большей пектиназной активностью, что согласуется с литературными данными [8].

Как видно (см. табл. 2.) амилолитическая активность была обнаружена только в плодовом теле трутовика. Существуют данные свидетельствующие о конститутивном характере биосинтеза амилаз у дереворазрушающих грибов [8,9]. У остальных видов грибов амилолитической активности не обнаружено, что может быть связано с таким явлением как субстратная индукция. Это явление было описано и для амилолитических ферментов [10].

Итак, в исследованных образцах весьма высок уровень активности протеолитических, целлюлолитических и пектолитических ферментов.

Отдельные образцы (трутовик) обладают амилолитической активностью. У грибов сапротрофов активность амилаз нами не выявлена.

Высшие грибы являются ценным источником белка и ферментов - гидролаз и могут быть рассмотрены в качестве источника этих соединений при искусственном культивировании.

Библиографический список

1. Петров П.Т., Скрипко А.Д., Литвинова К.В. Новые лекарственные средства на основе биологически активных соединений мицелиальных грибов // Успехи медицинской микологии. 2006. - Т. 7. - С. 198-199.

2. Псурцева Н.В., Кияшко А.А., Шахова Н.В. Эколого-таксономические предпосылки получения плодовых тел в культуре макромицетов, представляющих интерес для медицины // Успехи медицинской микологии. 2007. - Т. IX. — С. 254-258.

3. Шпирная И.А., Умаров И.А., Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И. Определение активности гидролаз и их ингибиторов по гидролизу субстрата в геле агарозы // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т.45. № 4. С.497-501.

4. Уфимцева О.В. Характеристика аминокислотного состава глубинной культуры грибов вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) и серно-желтого трутовика (*Lactiopus sulphureus*)// Вестник биотехнологии физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2006. т.2, №4. с.52-54.

5. Дьяков Ю.Т. Грибы и их значение в жизни природы и человека // Соросовский образовательный журнал, 1997, №3, с. 38-45

6. Бухало А.С. Высшие базидиомицеты продуценты пищевого белка в глубинной культуре //Тез. докд. всесоюзн.конф. и мицелиальные грибы. Пушино. 1983.- 99с.

7. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. -М.: Наука, 1971. - 414 с.

8. Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Трутнева И.А. Ферментные системы высших базидиальных грибов— Киев: Наук.думка,1989-280с.

9. Беккер З.Э Физиология и биохимия грибов. – М.: изд-во Моск. ун-та,1988 – 230с.

10. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л. Как растения защищаются от болезней.М.: Наука, 1985 - 192 с.

СОДЕРЖАНИЕ

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ГЕНЕТИКЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Антоненко Е.В.

SSR АНАЛИЗ ЛОКУСОВ 5А ХРОМОСОМЫ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ У
ГЕНОТИПОВ, КОНТРАСТНЫХ ПО ОТЗЫВЧИВОСТИ В КУЛЬТУРЕ
ПЫЛЬНИКОВ..... 5

Байрамгулов Н.Р.

МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ РОДИОЛЫ
ИРЕМЕЛЬСКОЙ (*RHODIOLA IREMELICA BORISS.*)..... 11

Богданова М.В.

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ СОРТОВ ЛЬНА, ВКЛЮЧЕННЫХ В
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСИ..... 19

Братилова Н.П., Шамова С.С.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ РОСТА ДЕКАПИТИРОВАННОЙ
42-ЛЕТНЕЙ СОСНЫ КЕДРОВОЙ СИБИРСКОЙ В УСЛОВИЯХ
КАРАУЛЬНОГО УЧАСТКОВОГО ЛЕСНИЧЕСТВА 27

Байрамгулова З.Х., Редькина Н.Н., Байрамгулов Н.Р.

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОФОНДА СОЛОДКИ КОРЖИНСКОГО НА ЮГО-
ВОСТОКЕ БАШКОРТОСТАНА 34

Беляченко Ю.А., Усанов А.Д., Тырнов В.С., Усанов Д.А.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТИМУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
НИЗКОЧАСТОТНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА АПИКАЛЬНЫЕ
КОРНЕВЫЕ МЕРИСТЕМЫ ЧЕЧЕВИЦЫ *LENS CULINARIS* MEDIC..... 40

Габитова А.А., Гайнанов С. Г., Ахметов А.Р.

ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ В
ШИРОКОЛИСТВЕННЫХ ЛЕСАХ НА ВОСТОЧНОЙ ГРАНИЦЕ
АРЕАЛОВ..... 47

Давлетов Ф.А., Гайнуллина К.П.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ
ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.)..... 50

Зарецкая М. В., Курбидаева А. С, Новокрещенова М. Г., Куприянова Е. В.,

Ежова Т. А., Федоренко О. М.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АДАПТАЦИИ: ВРЕМЯ ЦВЕТЕНИЯ И
УСТОЙЧИВОСТЬ К ХОЛОДУ У *aRABIDOPSIS THALIANA* (L.) 59

Киньябулатов С.С.	
СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА <i>INULA HELENIUM</i> L. В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН НА ПОПУЛЯЦИОННОЙ ОСНОВЕ.....	65
Колосовская Ю.Е., Матвеева Р.Н.	
ИЗМЕНЧИВОСТЬ КЕДРОВЫХ СОСЕН НА АРХИВНОМ УЧАСТКЕ ДЕНДРАРИЯ СИБГТУ	70
Музафарова А.А., Галеев Э. И.	
ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ В ТЕХНОГЕННЫХ ЗОНАХ.....	76
Музафарова А.А., Кулагин А.А., Гасымов Р.Т.	
РАЗЛИЧНАЯ ПОПУЛЯЦИОННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПОДРОСТА ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ В РАЗНЫХ ТЕХНОГЕННЫХ УСЛОВИЯХ	80
Муллагулов Р.Ю.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РАСТЕНИЙ В ВЫБОРЕ ПРИНЦИПОВ ОХРАНЫ	82
Муллагулова Э.Р.	
ПАРАМЕТРЫ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЕСТЕСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ <i>JUNIPERUS SABINA</i> L. В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРИНЦИПОВ ОХРАНЫ	87
Янбаев Ю.А., Редькина Н.Н., Юсупова А.А.	
КЛОНОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИШНИ СТЕПНОЙ ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ.....	90
Федоров Н.И., Редькина Н.Н., Янбаев Ю.А., Михайленко О.И., Самойлова Л.Ю.	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ИЗОФЕРМЕНТНЫХ ЛОКУСОВ ВИДОВ <i>THALICTRUM</i> L. НА ЮЖНОМ УРАЛЕ.....	92
Хисамов Р.Р., Фархутдинов Р.Г., Хасанов Ф.Р., Ташбулатов Р.К.	
ОПТИМИЗАЦИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛИПНЯКОВ В ПРЕДУРАЛЬСКОЙ СТЕПИ БАШКОРТОСТАНА.....	94

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ПО ГЕНЕТИКЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

Валитов Ф.Р., Хаков Р.М.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДИСТАНЦИЙ МЕЖДУ ПОРОДАМИ ПРИ СЕЛЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА	99

Гайнуллина К.П., Андреева Е.С., Фаузетдинова Э.Т. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛОШАДЕЙ БАШКИРСКОЙ ПОРОДЫ	101
Ганиева И.Н., Долматова И.Ю. ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПЕКИНСКИХ УТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RAPD-МАРКЕРОВ	106
Ганченкова Т.Б., Калашникова Л.А, Хабибрахманова Я.А. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЭСТРОГЕНОВОГО, ПРОЛАКТИНОВОГО И РИАНОДИНОВОГО РЕЦЕПТОРОВ У СВИНЕЙ.....	109
Гареева И.Т. ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ПРОЛАКТИНА И β-ЛАКТОГЛОБУЛИНА С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КОРОВ ЧЁРНО-ПЁСТРОЙ ПОРОДЫ	115
Герасимова Л.В., Янбаев Ю.А. ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСА LDH-1 И КАЧЕСТВО ВОЛОСЯНОГО ПОКРОВА У АМЕРИКАНСКИХ НОРОК.....	120
Гумеров У.Р., Исламова С.Г. АНТИГЕННЫЙ СОСТАВ ГРУПП КРОВИ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОРОДНОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ	122
Джапаридзе Г. М., Хабибрахманова Я. А., Калашникова Л. А. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ CSN3, VLG, PRL, GN У ГОЛШТИНСКИХ КОРОВ	125
Дятлов Д.А., Пушкарев В.П., Куликов Л.М., Леконцев Е.В., Пушкарева Ю.Э., Пушкарев Е.Д. ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ТРОМБОФИЛИЕЙ, У СПОРТСМЕНОВ РАЗНЫХ ВИДОВ СПОРТА	131
Жур К.В., Кундас Л.А., Бышнёв Н.И., Морозик П.М., Моссэ И.Б. АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА NF1A С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ВЫСОКИМ СПОРТИВНЫМ ДОСТИЖЕНИЯМ.....	135
Зятьков С.А., Гончаренко Г.Г., Лысенко А.Н. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ <i>FELIS CATUS</i> ВОСТОЧНОЙ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ЗАПАДНОЙ ЕВРОПЫ	139
Ибрагимова Г.Р., Валитов Ф.Р. ВЗАИМОСВЯЗЬ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛОКА КОРОВ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ С ПОЛИМОРФИЗМОМ ПО ГЕНУ КАППА - КАЗЕИНА	146

Ильясов А.Г.	
ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ КАППА-КАЗЕИНА, ПРОЛАКТИНА И СОМАТОТРОПИНА НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА.....	148
Ильясов Р.А., Макаров В.Л., Поскряков А.В., Николенко А.Г.	
ПОПУЛЯЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СРЕДНЕУРАЛЬСКОЙ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ	155
Ильясова Э.И., Петрова И. Г.	
ЗАВИСИМОСТЬ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КОРОВ ОТ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКОГО СХОДСТВА РОДИТЕЛЕЙ	158
Калашников А.Е., Масленников И.В., Колбина Л.М., Удина И.Г.	
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ APIS MELLIFERA L. РЕСПУБЛИКИ УДМУРТИЯ	160
Кононенко Т.В., Долматова И.Ю.	
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ III ИНТРОНА ГЕНА ТИЭСТЕРАЗЫ СИНТАЗЫ – S АЦИЛ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (S-AFAST) УТОК.....	166
Люханов М.П., Короткевич О.С.	
ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TNF-A В ПОПУЛЯЦИЯХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА.....	169
Плотникова Е.Ю., Прудникова А.С., Калашников А.Е., Учаева В.С., Васильев Ю.А.	
ИЗУЧЕНИЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ РАСЩЕЛИНАМИ ГУБЫ И НЕБА НА ОСНОВЕ МЕДИЦИНСКОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ И АНАЛИЗА ДИСПАНСЕРНОЙ БАЗЫ	172
Сафаргалин А.Б., Абдулгазина Н.М., Юмагужин Ф.Г.	
СТЕПЕНЬ ГИБРИДИЗАЦИИ БУРЗЯНСКОЙ БОРТЕВОЙ ПЧЕЛЫ В ПРЕДЕЛАХ АРЕАЛА	176
Сахаутдинов И.Р., Муратова Л.М., Гумеров У.Р., Исламова С.Г.	
АССОЦИАЦИИ ГРУПП КРОВИ С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КОРОВ	180
Сурков А.А., Гончаренко Г.Г., Митрофанов В.Г.	
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ИНДИКАТОРНЫХ ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ	183
Траспов А.А., Зиновьева Н.А., Долматова И.Ю.	
ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ В ГРУППАХ КОРОВ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ	189

Юмагузин И.Ф.

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ
ГЕНА K-CAS У ЖИВОТНЫХ РАЗНОЙ СЕЛЕКЦИИ 192

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ПО ГЕНЕТИКЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Андреева А.В., Николаева О.Н.

МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ МИКРОФЛОРЫ
ЭНТЕРОБИОЦЕНОЗА МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ..... 196

Денисова С.Г., Пупыкина К.А., Миронова Л.Н., Реут А.А.

РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
КОРНЕКЛУБНЕЙ ГЕОРГИН В БОТАНИЧЕСКОМ САДУ ГОРОДА УФЫ 198

Ибрагимов Р.И., Шпирная И.А., Цветков В.О.,
Яруллина Л.Г., Валиахметова К.И.

АКТИВНОСТЬ ПЕКТИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ЛИСТЬЯХ ЯРОВОЙ
ПШЕНИЦЫ В СВЯЗИ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ СОРТОВ К *SEPTORIA*
NODORUM BERK 202

Лопатин Н.В., Киреева Н.А., Григориади А.С.

КОМПЛЕКСНАЯ БИОРЕМЕДИАЦИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ .. 208

Лукьянцев М.А., Хайруллин Р.М.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ
ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* 213

Лысенко А.Н., Гончаренко Г.Г., Катохин А.В.

ПЦР-ДИАГНОСТИКА *OPISTHORCHIS FELINEUS* ПО ITS2-МАРКЕРНЫМ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ В ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ХОЗЯЕВАХ –
МОЛЛЮСКАХ-БИТИНИЯХ И РЫБАХ СЕМЕЙСТВА КАРПОВЫЕ 218

Мухортова О.В., Сабитова Р.З.

ВЕРТИКАЛЬНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЗООПЛАНКТОНА
В ОЗЕРЕ КАНДРЫКУЛЬ (БАШКОРТОСТАН)..... 227

Насибуллин Р.И., Киреева Н.А., Григориади А.С.

ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА УСКОРЕНИЕ ДЕСТРУКЦИИ
НЕФТИ В ВОДОЕМЕ 234

Сафиуллина М.Г., Кулуев Б.Р.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ
ТАБАКА, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЭКСПАНСИНЫ..... 238

Тыщенко В.И., Новикова О.Б., Борисенкова А.Н., Белаш Д.Э., Терлецкий В.П. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ДРИМ (ДВОЙНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ И ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ МЕЧЕНИЕ) ...	239
Уразбахтина Д.Р., Хайруллин Р.М. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПУТЕЙ БЕЗОПАСНОЙ РЕГУЛЯЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ К ТОКСИНАМ ГРИБОВ Р. <i>FUSARIUM</i> У ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ	245
Шпирная И.А., Мещерякова Е.С., Цветков В.О., Бережнева З.А., Ибрагимов Р.И. ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ В ПЛОДОВЫХ ТЕЛАХ ГРИБОВ КЛАССА BASIDIOMYCETES.....	247

Научное издание

«Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии» в рамках фестиваля науки»

МАТЕРИАЛЫ

всероссийской молодежной конференции
в рамках Федеральной целевой программы
«Научные и научно-педагогические кадры
инновационной России» на 2009-2013 годы

(Уфа, Россия, 24-28 сентября 2012 г.)

Печатается в авторской редакции

Технический и художественный редактор: *А. Е. Дереева*

Подписано в печать **26. 09. 2012** г. Формат бумаги 60×84¹/₁₆
Усл.-печ. л. **14, 88**. Уч.-изд. л. **14, 36**. Бумага офсетная
Гарнитура «Таймс». Печать трафаретная. Заказ **408**. Тираж **150** экз.

Типография ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет»
450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34