

SNABI-ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА (*bIGF-1*) У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

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

Введение

В современную практику животноводства широко внедряются научные разработки, основанные на применении молекулярных методов тестирования. Поэтому поиск предпочтительных аллелей генов, обуславливающих повышение продуктивности животных, имеет большое значение для селекции. Признаки мясной и молочной продуктивности являются экономически важными и находятся под контролем многих генов, в том числе и генов инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*) и инсулиноподобного фактора роста-2 (*bIGF-2*).

Инсулиноподобные факторы роста-1 и 2 (*IGF-I*, *IGF-II*) являются белковыми факторами множественного действия, которые регулируют рост, развитие, дифференциацию клеток тканей-мишеней (в частности, ткани молочной железы) и участвуют в реализации различных физиологических функций, в том числе и процесс лактации. Предположительно, основным источником *IGF* является печень, однако имеются данные о секреции инсулиноподобных факторов в клетках молочной железы [1-3]. Это позволяет рассматривать гены инсулиноподобных факторов в качестве потенциальных генов-кандидатов для применения в маркер-сопутствующей селекции.

Белки инсулиноподобных факторов – участники соматотропиновой системы гуморальной регуляции ряда метаболических циклов или соматотропинового каскада. Запуск каскада инициируется гипофизарным фактором роста (*Pit-1*), стимулирующим выработку гормона роста (*GH*) и пролактина (*PRL*) в клетках гипофиза. Гормон роста или соматотропин выделяется в кровь и активизирует специфические физиологические

механизмы в тканях-мишенях посредством связывания с мембранным клеточным рецепторным белком (*GHR*). На следующем этапе передачи гормонального сигнала происходит выработка белков *IGF-1* и *IGF-2*, которые непосредственно регулируют внутриклеточный метаболизм в тканях-мишенях. Таким образом, *IGF-1* так же, как и *IGF-2* является медиаторами эффекта соматотропина на лактацию у млекопитающих.

Белки *IGF-1* и *IGF-2* принадлежат к семейству структурно-родственных полипептидов, которое также включает гормоны инсулин и релаксин. Белки-участники этого семейства обладают аминокислотной гомологией друг с другом и сходными биологическими эффектами.

У млекопитающих ген *bIGF-1* состоит из шести экзонов и составляет 90 килобаз хромосомальной ДНК [1]. У мышей и человека идентифицированы два промотора выше двух лидирующих экзонов [4, 5]. В области 5-штрих-фланкирующих регионов первого и второго экзонов исследованы несколько сайтов старта транскрипции [6, 7]. Наличие различных сайтов старта транскрипции обусловлено тканеспецифичностью, а также зависит от физиологического состояния клетки [8,6,9-11]. Двумя альтернативными лидирующими экзонами продуцируются два класса транскриптов. Во всех тканях, включая печень, на всех стадиях развития белки-транскрипты класса I, образующиеся с первого экзона, являются основными белками инсулиноподобного фактора-I. Белки-транскрипты класса II, экспрессируемые со второго экзона, постоянно локализованы в зрелой печени (примерно 30% всех белков) и в некоторых других тканях в течение короткого

периода неонатального развития [9, 6, 10].

Зрелый белок IGF-I является однонитевым пептидом, состоящим из 70 аминокислот (молекулярный вес 7.646 Д). Последовательность аминокислот этого белка высококонсервативна для большинства изученных видов млекопитающих. Данный полипептид состоит из А, В, С, и D доменов, среди которых домены А и В обладают высокой гомологией с доменами А и В инсулина. Домен А связывает IGF-I со своим рецептором и инициирует последующие митогенные события, в то время как В домен участвует в образовании комплекса с IGF-связывающими белками [11, 12]. В неко-

торых тканях, кроме плазмы крови, был обнаружен укороченный на несколько аминокислот пептид IGF-I [13-16], который является скорее результатом посттрансляционной модификации гена [17].

Так как белок IGF-I опосредует действие гормона роста, то аллельные варианты гена *bIGF-I* могут быть применены в маркер-сопутствующей селекции. В настоящее время ведутся работы по поиску однонуклеотидных замен в данном гене и исследованию их связи с признаками продуктивности сельскохозяйственных животных, в частности крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Для анализа в качестве биологических образцов использовалась кровь 274 коров СПК «Снов» Минской обл. Эта выборка представлена 108 животными голштинской и 164 – черно-пестрой пород.

ДНК-типирование полиморфных вариантов гена инсулиноподобного фактора роста-1 проводили методом амплификации с дальнейшим анализом полиморфизма длин рестриктных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Для амплификации фрагмента гена *bIGF-I* использовали праймеры [18]:

f: 5'-ATTACAAAGCTGCCTGCCCC-3',
r: 5'-ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATACGT-3'

Полимеразная цепная реакция проводилась в амплификаторе “Biometra T-cycler”. Режим ПЦР: 31 цикл: 94°C-1 мин., 64°C-1 мин., 72°C-1 мин. Полученный амплификат обрабатывался рестриктазой *SnaBI* при температуре 37°C в течение 3-16 часов. Результаты рестрикции визуализируются в ультрафиолете, после разделения в 10% акриламидном геле. После рестрикции генотип АА визуализируется в виде двух полос 223 и 26 п.н., генотипу АВ соответствуют три полосы 249, 223 и 26 п.н., генотипу ВВ – одна полоса 249 п.н. (Рис.1).

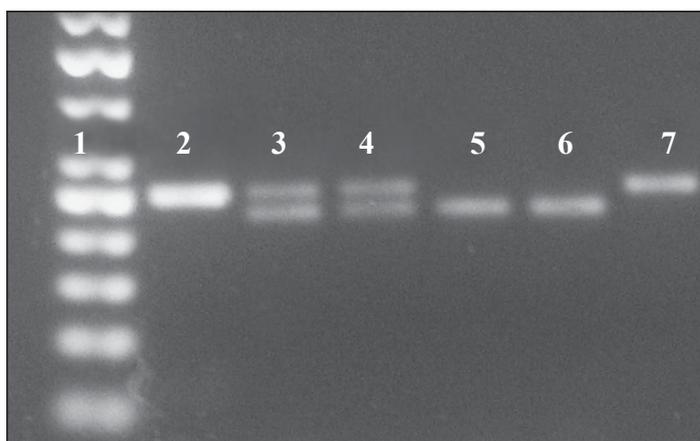


Рис. 1. ПЦР-ПДРФ анализ полиморфных вариантов гена *bIGF-I* крупного рогатого скота. Условные обозначения: 1 – маркер 50 bp DNA Lader (Fermentas); 2 – продукт амплификации, 3-7 продукты рестрикции; 3,4 – генотип АВ; 5,6 – генотип АА; 7 – генотип ВВ.

Результаты и обсуждение

SnaBI полиморфизм 5-штрих-фланкирующей области гена *bIGF-1* описан впервые В. Ги с соавторами в 1997 году [18, 19] и в дальнейшем идентифицирован как Т/С транзигция, в положении -472 относительно старта транскрипции (или положение 512 выше АТГ кодона соответственно AF210383 последовательности в GenBank), распознаваемая с помощью рестриктазы *SnaBI* [2]. Было выявлено два аллеля: аллель *bIGF^A* (нуклеотид Т в положении -472) и мутантный аллель В (нуклеотидом С). Аллель *bIGF^A* является более распространенным. Установлено, что генотип *bIGF^{BB}* связан с высокими показателями мясной продуктивности крупного рогатого скота [20]. В Польше Е. Сиадковская исследовала *SnaBI*-полиморфизм и его связь с молочной продуктивностью польской популяции голштинско-фризской породы крупного рогатого скота. Ею было отмечено, что коровы с генотипом *bIGF-1^{AB}* характеризуются более высокой продуктивностью молочного жира и белка по

сравнению с гомозиготными особями *bIGF-1^{AA}* и *bIGF-1^{BB}* [21]. Дж. Ким изучала связь данного полиморфизма с мясными и молочными признаками у представителей ангусского, симментальского, шаролецкого и герефордского скота [4]. Показано, что коровы с генотипом *bIGFAA* давали больше молока в сутки а так же приносили более крупных телят. Однако в работах Дж. Ли с соавторами, не выявлено связи этого одноклеотидного полиморфизма с признаками мясной продуктивности у ангусского скота [20].

Нами проведен анализ генетической структуры исследуемой выборки крупного рогатого скота племпредприятий Минской области по частоте встречаемости генотипов и аллелей гена *bIGF-1*. Результаты исследования представлены в таблице 1. Анализ частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *bIGF* показал, что у представителей голштинской и черно-пестрой породы частота встречаемости аллельного варианта *bIGF^B* составляет 0,4-0,41.

Таблица 1

Частоты встречаемости *SnaBI*-полиморфных локусов гена *bIGF-1* у исследованной группы животных СПК «Снов»

	Кол-во особей (n)	bIGF-I				
		Частота встречаемости генотипов, %			Частота встречаемости аллелей, %	
		AA	AB	BB	A	B
Голштинская порода	108	39,81	40,75	19,44	0,6±0,05	0,4±0,05
Черно-пестрая	164	36,58	45,12	18,3	0,59±0,04	0,41±0,04

Нами проанализирована связь полиморфных вариантов гена *bIGF* по *SbaBI*-сайту рестрикции с такими признаками молочной продуктивности, как общий удой молока, общая продуктивность молочного жира и общая продуктивность молочного белка за 305 суток лактации. Средние показатели

исследуемых параметров молочной продуктивности по породам приведены в таблице 2.

Выявлена статистически значимая связь генотипа *bIGF^{BB}* с такими признаками, как общий удой, общая продуктивность молочного жира у черно-пестрой породы ($P < 0,05$).

Таблица 2

Связь аллельных вариантов гена *bIGF* со средними показателями молочной продуктивности у голштинской и черно-пестрой пород

Генотип особи	Средние показатели молочной продуктивности у коров голштинской и черно-пестрой пород (305 суток лактации)					
	Удой, л		Жир, кг		Белок, кг	
	Голштинская	Черно-пестрая	Голштинская	Черно-пестрая	Голштинская	Черно-пестрая
<i>bIGF^{AA}</i>	10169,80 ±139,27	8932,78 ±80,11	364,81 ±4,15	341,32 ±2,85	314,12 ±3,82	288,44 ±2,30
<i>bIGF^{AB}</i>	10225,84 ±117,72	8885,23 ±80,07	371,15 ±3,66	338,65± 2,84	315,61± 3,00	285,92± 2,41
<i>bIGF^{BB}</i>	9945,10 ±107,36	9251,00* ±92,83	367,78 ±4,14	352,92± 2,78*	301,45± 3,02	300,00± 2,4

*P<0,05

При анализе показателей продуктивности коров черно-пестрой породы выявлены следующие тенденции. Так, средний показатель общего удоя у представителей черно-пестрой породы генотипа *bIGF^{BB}* выше на 318,22 л по сравнению с обладателями *bIGF^{AA}* генотипа (рис.2), что составляет 3,5% (P<0,05). Коровы генотипа

bIGF^{BB} характеризуются так же более высоким показателем продуктивности жира за 305 суток лактации, по сравнению с носителями генотипа *bIGF^{AA}* (рис.3). В частности, показано, что общая продуктивность молочного жира у коров с генотипом *bIGF^{BB}* 11,6 кг/год выше, чем у коров с генотипом *bIGF^{AA}*, что составляет 3,39%.

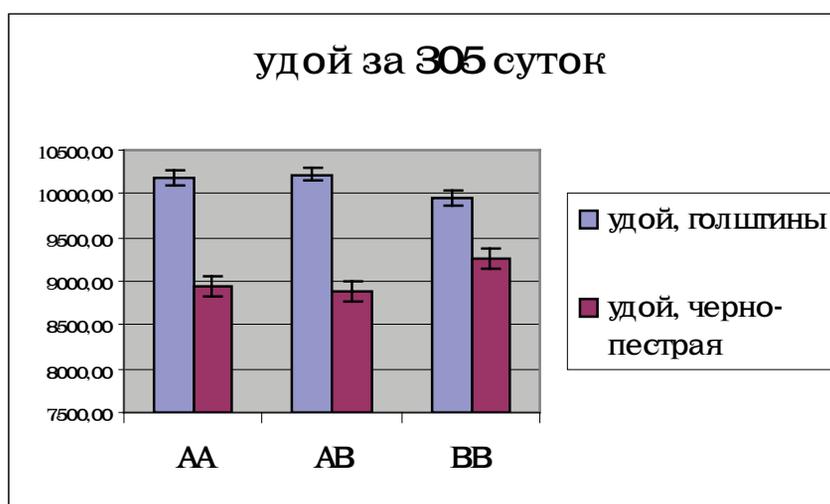


Рис. 2. Средний показатель удоя за 305 суток лактации у коров по *SnaBI*-полиморфным локусам гена *bIGF-I* голштинской и черно-пестрой пород.

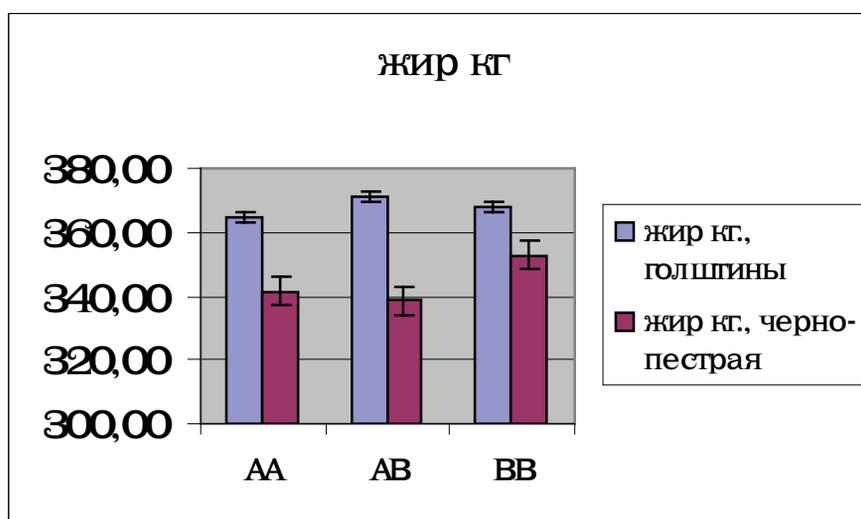


Рис. 3. Средний показатель продуктивности молочного жира за 305 суток лактации у коров по *SnaBI*-полиморфным локусам гена *bIGF-I* голштинской и черно-пестрой пород.

Проведен анализ частот встречаемости аллелей *bIGF-I^A* и *bIGF-I^B* в группах животных с разным уровнем продуктивности по каждому признаку. Для этого исследуемая выборка по каждой породе была разделена на две группы. В I-ую группу отбирались животные, показатель продуктивности которых по данному при-

знаку был ниже среднего по выборке. Во II-ую группу, соответственно, включены животные с показателями продуктивности выше средней. В дальнейшем провели сравнение аллельных вариантов гена *bIGF-I* с показателями молочной продуктивности по выделенным группам у голштинской и черно-пестрой пород (табл. 3,4).

Таблица 3

Частоты встречаемости аллелей *bIGF-I^A* и *bIGF-I^B* в группах с разными показателями продуктивности у животных голштинской породы.

Средние показатели продуктивности по группам	К-во особей (n)	Генотип животных (к-во особей)			Частота аллелей	
		<i>AA-bIGF-I</i>	<i>AB-bIGF-I</i>	<i>BB-bIGF-I</i>	<i>bIGF-I^A</i>	<i>bIGF-I^B</i>
I-ая группа Удой, л (<10147,81)	40	19	21	0	0,74±0,06	0,26±0,06
II-ая группа Удой, л (>10147,81)	68	24	23	21	0,52±0,06	0,48±0,06
I-ая группа Жир, кг (<367,971)	45	24	21	0	0,77±0,06	0,23±0,06
II-ая группа Жир, кг (>367,97)	63	19	23	21	0,48±0,06	0,52±0,06
I-ая группа Белок, кг (<312,262)	55	22	19	14	0,57±0,06	0,43±0,06
II-ая группа Белок, кг (>312,262)	53	21	25	7	0,63±0,06	0,37±0,06

Таблица 4

Частоты встречаемости аллелей *bIGF-I^A* и *bIGF-I^B* в группах с разными показателями продуктивности у животных черно-пестрой породы

Средние показатели продуктивности по группам	К-во особей (n)	Генотип животных (к-во особей)			Частота аллелей	
		<i>AA-bIGF-I</i>	<i>AB-bIGF-I</i>	<i>BB-bIGF-I</i>	<i>bIGF-I^A</i>	<i>bIGF-I^B</i>
I группа Удой, л (<8967,30)	77	29	36	12	0,61±0,06	0,39±0,06
II группа Удой, л (>8967,30)	87	31	38	18	0,57±0,05	0,43±0,05
I группа, Жир, кг (<342,15)	40	15	21	4	0,64±0,08	0,36±0,08
II группа Жир, кг (>342,15)	124	45	54	25	0,58±0,04	0,42±0,04
I группа Белок, кг (<289,10)	80	31	39	10	0,63±0,05	0,37±0,05
II группа Белок, кг (>289,10)	84	29	36	19	0,56±0,05	0,44±0,05

Выявлено, что у представителей голштинской породы, выделенных по признаку жир и удой, во второй группе, показатели продуктивности в которой выше средних, наблюдается более высокая частота аллеля В. (табл.3). По признаку продуктивности белка в молоке, низ-

кие показатели молочного белка связаны с высокими частотами аллеля *bIGF-I^B* (табл.3).

У представителей черно-пестрой породы по всем признакам, в группах с наибольшим показателем продуктивности сохраняется наибольшая частота аллеля *bIGF-I^B* (табл.4).

Заключение

Анализ частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *bIGF* показал, что у представителей голштинской и черно-пестрой пород частота встречаемости аллельного варианта *bIGF^B* составляет 0,4-0,41.

Аллель *bIGF-I^B*, обусловленный однонуклеотидным полиморфизмом промоторной зоны гена *bIGF-I*, связан с высокими показателями молочной продуктивности у черно-пестрой породы.

У представителей черно-пестрой породы показатель общего удоя *bIGF^{BB}* выше на 318,22 л по сравнению с обладателями *bIGF^{BB}* генотипа, что составляет 3,5%. Разница общей продуктивности жира у животных данной породы с генотипом *bIGF^{BB}* и *bIGF^{AA}* составляет 11,6кг/год, что составляет 3,39%.

У голштинской и черно-пестрой пород при разделении исследуемой выборки коров

на группы с продуктивностью ниже и выше среднего (I-ая и II-ая группы), по всем исследуемым признакам, в группах с показателями продуктивности выше среднего наблюдается более высокая частота аллеля *bIGF-I^B*. Исключение составляют группы, выделенные по признакам белковой продуктивности у голштинской породы, где низкие показатели молочного белка связаны с более высокими частотами аллеля *bIGF-I^B*.

Таким образом, однонуклеотидный полиморфизм промоторной зоны гена инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-I*) связан с высокими показателями молочной продуктивности у черно-пестрой и голштинской пород, что предполагает в дальнейшем использовать его в маркер-сопутствующей селекции, направленной на повышение молочной продуктивности крупного рогатого скота.

Список использованных источников

1. Rotwein, P. S. Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver / P. S. Rotwein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1986. – Vol. 83, P. 75–77.
2. The ovine insulin-like growth factor-I gene: characterization, expression and identification of a putative promoter / M. Dickson [et al.] // J. Mol. Endocrinol. – 1991. – Vol. 6, P. 17.
3. Insulin-like growth factors / D. LeRoith [et al.] // Annals New York Acad. Sci. – 1993. – Vol. 692, P. 1.
4. Structure and function of a human insulin-like growth factor I gene promoter / S. Kim [et al.] // Mol. Endocrinol. – 1991. – Vol. 5, P. 64.
5. Functional analysis of the rat insulin-like growth factor I gene and identification of an IGF-I gene promoter / L. Hall. [et al.] // DNA Cell Biol. – 1992. – Vol. 11, P. 301.
6. Regulation of start site usage in the two leader exons of the rat insulin-like growth factor I gene by development, fasting and diabetes / M. Adamo [et al.] // Mol. Endocrinol. – 1991. – Vol. 5, P. 1677.
7. Identification of multiple transcription start sites in the human insulinlike growth factor I gene / E. Jansen, [et al.] // Mol. Cell Endocrinol. – 1991. – Vol. 78, P. 115.
8. Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat / L. Murphy [et al.] // Endocrinology. – 1987. – Vol. 120, P. 1279.
9. Distinct promoters in the rat insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene are active in CHO cells. / M. Adamo [et al.] // Endocrinol. – 1993. Vol. 132, P. 935.
10. Tissue-specific transcription start site usage in the leader exons of the rat IGF-I gene: evidence for differential regulation in the developing kidney / J. Shemer [et al.] // Endocrinol. – 1997. – Vol. 13, P. 2793.
11. Multiple transcription start sites in the rat insulin-like growth factor-I gene give rise to IGF-I mRNAs that encode different IGF-I precursors and are processed differently *in vitro*. / J. G. Simmons [et al.] // Growth Factors. – 1993. Vol. 9, P. 205.
12. Hybrid molecules containing the A domain of insulin-like growth factor-1 and the B chain of insulin have increased mitogenic activity relative to insulin / [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1987. – Vol. 149, P. 672.
13. Isolation and characterization of variant IGF-1 as well as IGF-2 from adult human brain / C. Carlsson-Skewitz [et al.] // FEBS Lett. – 1986. – Vol. 210, P. 46.
14. Purification and partial sequence analysis of insulinlike growth factor-I from bovine colostrum / G. Francis [et al.] // Biochem. J. – 1986. – Vol. 233, P. 207.
15. Characterization of somatomedins from human fetal brain: identification of a variant of insulin-like growth factor I. V. Sara [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1986. Vol. 83, P. 4904.
16. Identification and purification of a cloned insulin-like growth factor I from porcine uterus: Evidence for high biological potency / M. Ogasawara [et al.] // Biochemistry. – 1989. Vol. 28, P. 2710.
17. Characterization of two DNAs encoding insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the human fetus brain / A. – C. Sandberg-Nordqvist [et al.] // Mol. Brain Res. – 1992. – Vol. 12, P. 275.
18. A genetic marker associated with blood serum insulin like growth factor-I (IGF-I) concentration and growth traits in Angus cattle / W. Ge [et al.] // J. Anim. Sci. – 1997. Vol. 75, P. 32.
19. Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF I gene / W. Ge [et al.] // Anim. Genet. – 1997. – Vol. 28, P. 155.
20. Assessment of positional candidate genes *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus* / J. Le [et al.] // J. Anim Sci. – 2004 Vol. 82, P. 1–7.
21. 2006 Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle / E. Siadkowska [et al.] // Animal Science Papers and Reports. – 2006. – Vol. 24 № 3. – P. 225–237.

Дата поступления статьи 5 мая 2009 г.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ПАСПОРТИЗАЦИИ СОРТОВ ГРУШИ

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

²РУП «Институт плодоводства»
Республика Беларусь, 223013, Минская обл.,
Минский р-н, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2.

Введение

Груша является важной плодовой культурой в Беларуси. Она выращивается на территории страны на протяжении многих веков. В последние десятилетия наблюдается значительное увеличение сортового разнообразия этой культуры. По мере создания новых сортов груши возникает необходимость разработки более удобных и надежных методов их идентификации. Используемые в настоящее время морфологические признаки не всегда отвечают возрастающим требованиям селекционеров. Кроме того, они могут быть не достаточно стабильны под влиянием окружающей среды и проявляются чаще всего на поздних стадиях онтогенеза.

В настоящее время появилась возможность паспортизации генетических ресурсов плодовых культур и их сортовой идентификации на основе молекулярных маркеров. Молекулярные маркеры отличаются большим разнообразием и могут фланкировать различные по функциональной нагрузке участки генома. Молекулярные маркеры позволяют обнаружить различия между сортами на уровне ДНК, не требуя фенотипического проявления признака. Они могут быть применены на разных стадиях развития и роста растений, начиная с первого года жизни. Немаловажно, что идентификацию генотипов с помощью молекулярных маркеров можно осуществлять на любых тканях растения. В настоящее время наиболее эффективным молекулярным методом идентификации генома растений является метод SSR-анализа. Он основан на определении длины фрагментов локусов микросателлитных последовательностей с помощью фланкирующих их маркеров, выявляемых в результате полимеразной цепной реакции. SSR-локусы генома растений являются высокополиморф-

ными. Они деспергированы по всему геному и наследуются как кодоминантные признаки. Эти свойства позволяют успешно применять их для идентификации и паспортизации сортов сельскохозяйственных растений [1].

При разработке молекулярных методов идентификации сортов груши необходимо учитывать особенности строения и организации генома этого вида. Род груша (*Pyrus*), также как и яблоня (*Malus*), входит в семейство Rosaceae, подсемейство Maloideae. Для представителей этих родов характерно базовое число хромосом 17 ($2n=34$). Предполагалось, что груши, как и яблони, являются амфидиплоидами, которые произошли от двух предковых видов Rosaceae [2]. Исследования, проведенные с помощью анализа ДНК, показали, что полиплоидным происхождением представители родов *Pyrus* и *Malus* обязаны предковой форме с 9 хромосомами [3]. Геном этих видов сформировался в результате анеуплоидии от общего предкового вида. Вполне закономерно, что геномы яблони и груши имеют много общего как в организации, так и в структуре.

В первых исследованиях для идентификации генотипов груши были использованы изозимные маркеры [4, 5]. Вслед за ними RFLP, RAPD, ISSR, AFLP маркеры были привлечены для того, чтобы охарактеризовать различные генотипы и установить родственные связи среди видов и сортов груши [6, 7, 8, 9, 10, 11]. SSR-маркеры к геному груши специально не разрабатывались. В экспериментальных работах было показано, что часть SSR-маркеров к геному яблони можно с высокой эффективностью использовать для идентификации сортов груши, чему способствует общее происхождение этих видов [12]. В частности, характе-

ристика генотипов европейских и азиатских груш успешно была осуществлена с помощью микросателлитных маркеров яблони, сливы и японской груши [13].

В представленном исследовании для иден-

тификации сортов груши были применены SSR-маркеры генома яблони. Исследование проводилось с целью разработки универсального для обоих видов молекулярного метода паспортизации сортов.

Материалы и методы

Объекты исследования: Исследования проводились на коллекции сортов груши. Сорта взяты из сада РУП “Институт плодоводства”. В общей сложности в работе было использовано 34 сорта груши, среди них и сорта белорусской селекции. В коллекции были представлены 15 сортов, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь.

Выделение ДНК: Препараты ДНК выделяли с помощью Genomic DNA Purification Kit фирмы Fermentas. Выделение проводили из листового материала яблони согласно рекомендованному протоколу. Пробы растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды и хранили при -20°C . Для проведения ПЦР образцы разводили до концентрации 20 мкг/мкл.

Условия амплификации: Реакцию амплификации проводили с помощью SSR-маркеров CH01c06, CH02b12, CH02c02b, CH03d12, CH04h02, SdSSR [14, 15]. Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 20 мкл имела следующий состав: 67 мМ Трис-НСl рН 8,8, 16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 мМ MgCl_2 , 0,2 мМ dNTP, 250 нМ прямого и обратного праймеров, 50 мкг ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы. Условия проведения реакции: $94^{\circ}\text{C} - 3$ мин; 40 циклов $94^{\circ}\text{C} - 40$ сек, $60^{\circ}\text{C} - 1$ мин, $72^{\circ}\text{C} - 1$ мин; 1 цикл: $72^{\circ}\text{C} - 10$ мин. Для проведения реакции использовали амплификатор MyCycler (BIO-RAD).

Идентификация фрагментов амплификации: Продукты амплификации разделяли ме-

тодом электрофореза в секвенирующем акриламидном геле. Для проведения электрофореза использовали ДНК-секвенатор ALFexpress II (Amersham Biosciences). Разделение продуктов амплификации осуществляли в 6% акриламидном геле толщиной 0,3 мм. Электрофорез проводили в 1 х TBE-буфере (0.089 М Трис, 0.089 М борная кислота, 0.002 М EDTA рН 8.0) при следующих условиях: 400-600 В, 40 мА, 50 Вт, 55°C , интервал детекции 0,5 сек, время проведения 1-2 часа. Результаты электрофоретического разделения документировались автоматически с помощью программного обеспечения секвенатора.

Анализ уровня полиморфизма: Для оценки уровня полиморфизма использовали значение коэффициента полиморфизма. Коэффициент полиморфизма - PIC (polymorphic information content) был рассчитан отдельно для каждого локуса микросателлитных последовательностей генома груши. Значение коэффициента вычисляли по формуле:

$$\text{PIC} = 1 - \sum (P_i)^2$$

где P_i – частота встречаемости i -ого аллеля [16].

Уровень гетерозиготности H_o был рассчитан как отношение гетерозиготных генотипов к общему количеству генотипов.

Дендрограмма генетического сходства сортов была получена с помощью программы Treecon, основываясь на коэффициенте генетического сходства Nei и Li [17].

Результаты и обсуждение

Для проведения исследования была сформирована коллекция сортов груши. Коллекция представлена 34 образцами, среди которых 15 сортов груши, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь.

Выбранные для анализа маркеры ограничивают локусы микросателлитных повторяющихся последовательностей. Для разделения продук-

тов амплификации с указанными маркерами необходимо применять метод электрофореза в высокоточном акриламидном геле. В представленном исследовании фрагменты амплификации разделяли с помощью автоматического секвенатора. Экспериментальные исследования показывают, что точный размер аллелей локусов микросателлитных последовательностей методом электрофореза определить сложно

[14, 18]. Расчетные значения длин фрагментов могут колебаться в пределах 1-4 нуклеотида. Точность расчета зависит от используемого для исследования оборудования и реагентов (системы мечения праймеров, обычного аппарата для электрофореза, автоматического секвенатора и др.) [19]. В связи с этим возникает необходимость выбора стандарта, относительно которого будут проведены расчеты длины фрагментов амплификации. В представленном исследовании для расчета длины аллелей SSR локусов генома груши был использован сорт яблони Discovery. Сорт Discovery выбран как стандарт, рекомендованный для расчета длин аллелей при SSR-анализе сортов и видов яблони, так как он был включен во многие генетические исследования и являлся одним из родителей при создании картирующих популяций [14, 18]. Этот сорт служил также стандартом при разработке молекулярных методов идентификации сортов яблони [20].

Так как геном груши и яблони близок в генетическом отношении, для идентификации генотипов груши были использованы SSR-маркеры к геному яблони. При проведении исследования использована комбинация праймеров, разработанная для ДНК-паспортизации сортов яблони [20]. Результаты амплификации показали, что все взятые для анализа SSR-маркеры, созданные на основе генома яблони, имеют сайты связывания в геноме груши. В геноме груши выбранные локусы отлича-

ются высоким уровнем полиморфизма. Пример идентификации сортов груши с помощью SSR-маркера CH02C02b представлен на рисунке 1. Как видно из рисунка, каждому сорту соответствует свой набор аллелей SSR-локусов.

С помощью шести SSR-маркеров в геноме сортов груши, подвергнутых тестированию, выявлено от 7 до 17 полиморфных аллелей на локус (Табл. 1). Среднее значение аллелей на локус составляет 11,2. Пять маркеров являются монолокусными и выявляют не более двух аллелей на локус. Маркер CH02b12 выявляет до 4 аллелей и, следовательно, имеет более одного сайта связывания в геноме груши. Количество полиморфных аллелей в геноме груши несколько ниже, чем у яблони. Среднее количество аллелей этих же локусов в геноме яблони составляет 17,2. Следует отметить, что результаты приведены для 34 генотипов груши и 108 генотипов яблони. Выявление большего количества аллелей среди генотипов яблони связано с большей исследованной выборкой, а также с тем, что в анализе были использованы виды яблони, в составе генома которых были представлены дополнительные аллели [20]. Однако не исключено, что сорта груши характеризуются меньшим генетическим разнообразием по сравнению с яблоней. Так, Вунш и Хормаза отметили более низкое генетическое разнообразие среди 63 европейских сортов груши, исследованных с помощью семи микросателлитных маркеров, по сравнению с яблоней [21].

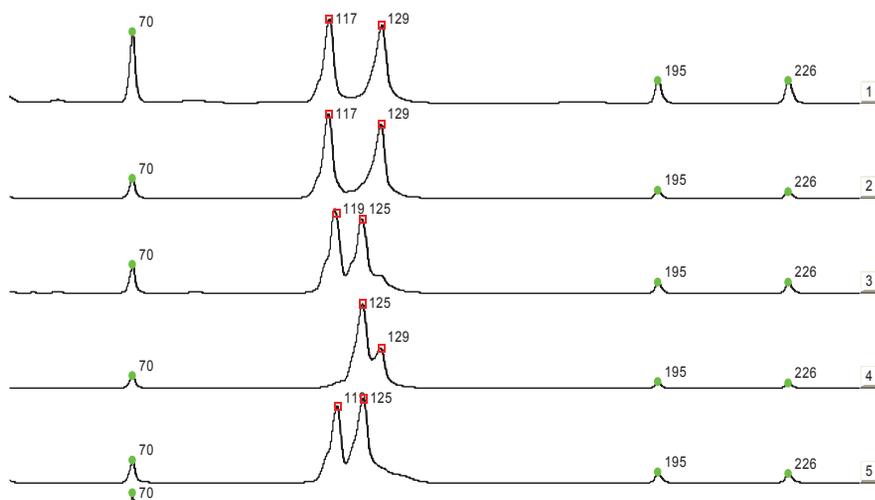


Рис. 1. Результаты разделения методом электрофореза в полиакриламидном геле продуктов амплификации ДНК сортов груши с праймером CH02C02b. Цифры 70, 195, 226 обозначают длину стандарта молекулярного веса в п.н. Номера над пиками – длины фрагментов в п.н., номера справа – порядковые номера образцов согласно таблице 4.

Таблица 1

Аллели, идентифицированные в геноме 34 сортов груши с помощью SSR-анализа

	Название праймера	Детектируемые SSR аллели в геноме груши. Длина в н.п.
1	CH01c06	150, 152, 154, 156, 158, 160, 164
2	CH02b12	101, 103, 112, 114, 116, 120, 124, 132, 134, 136, 138, 140, 144, 148, 152, 154, 160
3	CH02c02b	109, 111, 117, 119, 121, 125, 129, 133
4	CH03d12	89, 93, 95, 101, 111, 113, 115, 117, 123, 127
5	CH04h02	162, 164, 166, 168, 176, 182, 184, 186, 188, 190, 194, 202
6	SdSSR	140, 154, 158, 162, 164, 168, 170, 172, 174, 176, 1809, 186, 206

Размер аллелей локусов микросателлитных последовательностей в геноме груши незначительно отличается от размеров аллелей этих локусов в геноме яблони (Табл. 2). Наблюдаемые различия могут быть вызваны делециями или инсерциями отдельных нуклеотидов, которые возможны как в области микросателлитных последовательностей, так и во фланкирующих их областях.

Наблюдаемый уровень гетерозиготности (H_o) сортов груши имеет минимальное значение в локусе CH01c06, равное 0,41 (Табл. 3). Наибольшее значение уровня гетерозиготности отмечено для локуса SdSSR – 0,74. В среднем для рассмотренных генотипов H_o равно 0,54. Среди 108 образцов яблони уровень гетерозиготности в тех же локусах в среднем составляет 0,56.

Таблица 2

Название праймеров, длина и количество аллелей SSR-локусов в геноме сортов яблони и груши.

№	Название праймера	Хромосома	Длина аллелей в геноме яблони в н.п.	Кол-во детектируемых аллелей в геноме яблони	Длина аллелей в геноме груши в н.п.	Кол-во детектируемых аллелей в геноме груши
1	CH01c06	8	150-186	13	150-164	7
2	CH02b12	5	114-148	11	101-160	17
3	CH02c02b	4	76-125	8	109-133	8
4	CH03d12	6	97-151	14	89-127	10
5	CH04h02	11	150-274	40	162-202	12
6	SdSSR	7	159-211	17	140-206	13

Таблица 3

Коэффициент полиморфизма и уровень гетерозиготности (H_o) сортов груши, рассчитанный на основе SSR-анализа

№	Название праймера	PIС сортов яблони	H_o сортов яблони	PIС сортов груши	H_o сортов груши
1	CH01c06	0,80	0,47	0,73	0,41
2	CH02b12	0,83	0,73	0,80	0,53
3	CH02c02b	0,75	0,60	0,83	0,59
4	CH03d12	0,80	0,55	0,80	0,47
5	CH04h02	0,94	0,71	0,69	0,50
6	SdSSR	0,89	0,45	0,88	0,74
	Среднее	0,84	0,56	0,79	0,54

Самый высокий коэффициент полиморфизма и, следовательно, уровень информативности маркера наблюдается в локусе SdSSR. Наименьшее значение коэффициента полиморфизма имеет локус CN04h02 – 0,69. В целом рассмотренные локусы имеют высокий PIC, что свидетельствует как о хорошей информативности маркеров, так и о высоком уровне полиморфизма локусов микросателлитных последовательностей в геноме исследованных сортов груши. При сравнении коэффициента полиморфизма яблони и груши видно, что оба вида характеризуются высоким генетическим разнообразием аллелей локусов

микросателлитных последовательностей. Для рассмотренных локусов у груши среднее значение PIC равно 0,79, у яблони – 0,84. Таким образом, наблюдаемое разнообразие аллелей и уровень полиморфизма позволяет использовать данные маркеры для идентификации генотипов груши. По данным SSR-анализа для каждого сорта бал составлен генетический паспорт, в котором сорта представлены в виде набора аллелей в шести SSR-локусах (Табл. 4). Как видно из таблицы, среди протестированных сортов нет одинаковых по составу аллелей, выявляемых предложенной комбинацией SSR-маркеров.

Таблица 4

**Молекулярно-генетические паспорта сортов груши, созданные на основе SSR-анализа.
Длина аллелей обозначена в п.н.**

№	Название сорта	CN03d12	SdSSR	CN04h02	CN02b12	CN02c02b	CN01c06
1	Августовская роса	127	168,170	184,190	101,114,134,152	117,129	152,158
2	Белорусская поздняя	101,113	168,170	184,190	101,114,134,152	117,129	152,158
3	Бере лошицкая	113,127	154,172	184	101,114,124,134	119,125	152,158
4	Бере Люка	111,115	164	184	101,114,124,134	125,129	150
5	Большая летняя	111,115	162,164	184	101,138,144	119,125	150
6	Велеса	115,127	158,164	162,202	101,114,134	133	152,158
7	Верная	115,127	158,164	176,184	114,134	133	150,158
8	Видная	89,111	154,174	184	101,138,152	119	150
9	Вродлыва	89,117	164,184	164	120,138	119,125	152,160
10	Десертная росошанская	127	170	164,184	101,114,134,152	125,133	152
11	Духмяная	111	164	184	103,138,160	117,133	152
12	Дюшес летний	115	170,184	184,194	101,114,136,152	129,133	152,158
13	Золотоворотская	101,123	174	184	101,140	109,117	152
14	Колхозница	111,127	154,174	184	101,112,124,134	119,125	152
15	Конференция	111,127	154,174	184	112,124,134	133	152
16	Кудесница	115	154,176	182,202	101,124,138,144	125,133	152,158
17	Лагодная	115	154,176	184	101,124,144	117,133	158
18	Лира	127	164	164,184	103,138,160	119,125	150
19	Мраморная	127	164	164,184	103,114,134,160	129,133	150
20	Муратовская	127	164	164,176	154	117	150
21	Нарядная Ефимова	111	154,172	184,202	116,136,148	117	150
22	Памяти Яковлева	95,127	154,179	184	101,103,160	133	150,160
23	Пин-го-ли	89,93	140,154	166,186	116,136	111	154
24	Просто Мария	111	140,154	168,184	101	111,117	150
25	Светлянка	89,111	140,154	184	124,138	119	150,160
26	Сильва	127	154,206	184	101,103,154,160	119,133	150
27	Сладкая из Млиева	115	154,168	184	101,103,138,160	133	150
28	Сокровище	127	154	184	101,114,134,154	133	150
29	Талгарская красавица	127	176	176,184	138	111,133	150,156
30	Хони Дью	111	168,184	184,188	116	111,117	150
31	Чижевская	89,127	140,164	202	103,114,134,160	119,121	152,160
32	Юрате	113,127	162,170	162,184	101,103	129,133	152,158
33	Ясачка	111	168,172	182,190	114,124,134	117,133	150,158
34	Гибрид (Маргарита Марилья x P. communis) x P. yematsuana	115	162,184	184	116,132	117,119	152

Это наглядно видно на дендрограмме генетического сходства, построенной на основе проведенного анализа (Рис. 2). Все 34 сорта груши находятся на разном генетическом расстоянии друг от друга. Генетическое расстояние между сортами колеблется в пределах от 0,9 до 0,1, и сравнимо с таковым у яблони. В целом, сорта груши отличаются значительным

генетическим разнообразием, характерным для перекрестноопыляемых видов.

Таким образом, требованиям метода ДНК-паспортизации в достаточной степени соответствует предложенная комбинация из шести SSR-маркеров. С ее помощью можно идентифицировать на молекулярном уровне сорта как груши, так и яблони.

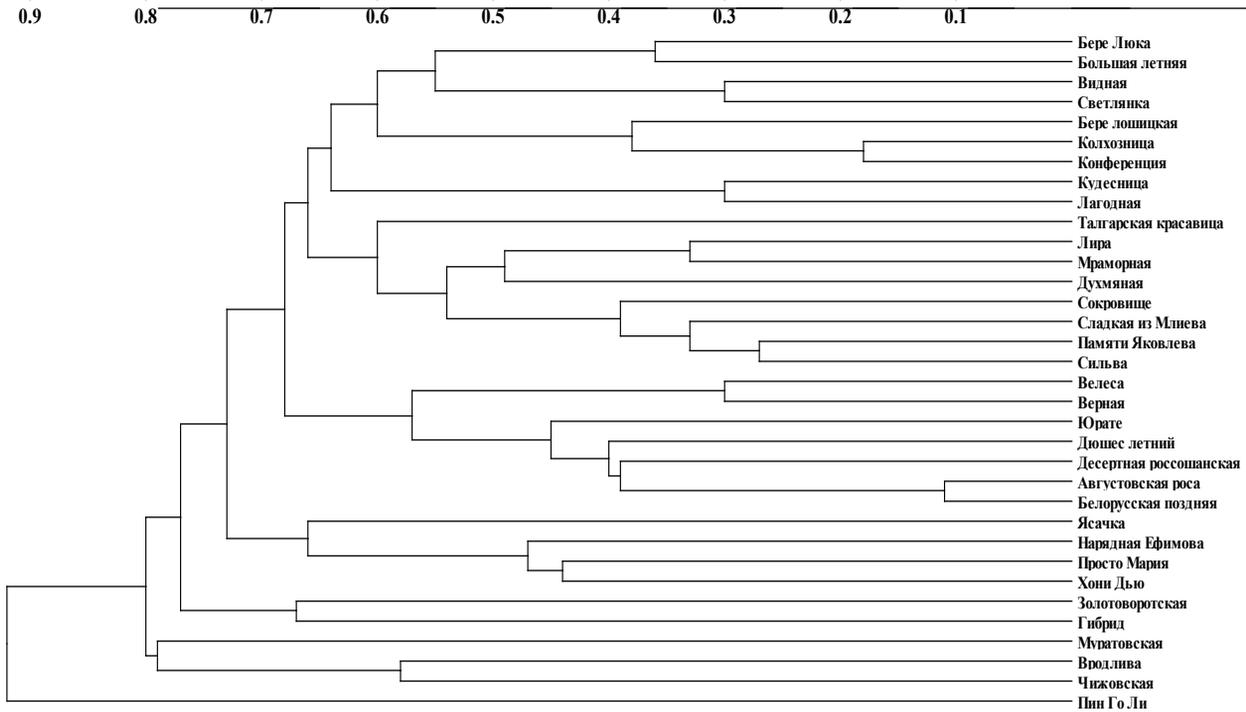


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства сортов груши, построенная на основе результатов анализа шести SSR-локусов.

При необходимости предложенную комбинацию маркеров можно расширить, что позволит идентифицировать практически неограниченное количество сортов.

Заключение

В представленном исследовании разработана система идентификации и ДНК-паспортизации генотипов сортов груши. Метод основан на использовании SSR-маркеров, выявляемых в результате полимеразной цепной реакции. Метод позволяет проводить анализ любых органов растений на различных стадиях онтогенеза. Для груши подобран набор из шести высокополиморфных SSR-маркеров CH01c06, CH02b12, CH02c02b, CH03d12, CH04h02, SdSSR, удобных в использовании, охватывающих различные области генома, достаточный для идентификации сортов. Представлена система регистрации

генотипов груши в виде паспорта сорта, который отображает аллельный состав локусов микросателлитных последовательностей. Предложенный метод ДНК-паспортизации обеспечивает возможность проверки соответствия сортов критериям отличимости, однородности и стабильности ООС-теста. Метод относится к новым технологиям и может быть использован для создания компьютерной базы данных ДНК-паспортов сортов, охраняемых в Республике Беларусь, в селекционной практике, для подтверждения соответствия сорта стандарту, для охраны авторских прав.

Список использованных источников

1. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК-маркеров / С.В. Малышев [и др.] // Методические рекомендации. Минск. – 2006. – 28 с.
2. Advances in fruit breeding. / R.E.C. Layne [et al.] // In: Janick J., Moore J.N. (Eds). Purdue University Press, West Lafayette. – Indiana. – 1975.
3. The origin of the apple subfamily (Maloideae: Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes / R.C. Evans [et al.] // Am. J. Bot. – 2002. – Vol. 89. – P. 1478–1484.
4. Identification of Callery pear cultivars by peroxidase isozyme patterns / F.S. Santamour [et al.] // Hered. – 1980. – Vol. 71. – P. 447–449.
5. Characterization of *Pyrus* species and cultivars using gradient polyacrylamide gel electrophoresis / R.A. Menendez [et al.] // J. Environ. Hortic. – 1986. – Vol. 4. – P. 56–60.
6. Incongruence between RFLP's of chloroplast DNA and morphological classification in East Asian pear (*Pyrus* spp.) / H. Iketani [et al.] // Genet. Resour. Crop Evol. – 1998. – V. 45. – P. 533–539.
7. Comparative analysis of chloroplast DNA in *Pyrus* species: physical map and gene localization / H. Katayama [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol. 106. – P. 303–310.
8. Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers / L. Monte-Corvo [et al.] // Genet. Resour. Crop Evol. – 2000. – Vol. 47. – P. 57–265.
9. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination / L. Monte-Corvo [et al.] // J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 2001. – Vol. 126. – P. 517–522.
10. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers / C. Oliveira [et al.] // Sci. Hort. – 1999. – Vol. 79. – P. 163–174.
11. Genetic relationships of *Pyrus* species and cultivars native to East Asia revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers / Y. Teng [et al.] // J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 2002. – Vol. 127. – P. 262–270.
12. Characterisation and transferability of apple SSRs to two European pear F population / L. Pierantoni [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 1519–1524.
13. European and Asian pear: simple sequence repeat-polyacrylamide gel electrophoresis-based analysis of commercial important North American cultivars / A.K. Ghosh [et al.] // Hort. Science. – 2006. – Vol. 41. – P. 304–309.
14. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.) / R. Liebhard [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol. 10. – P.217-241.
15. Cevik, V. High-resolution genetic analysis of the *Sd-1* aphid resistance locus in *Malus* spp / V. Cevik, G.J. King // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol.105. – P. 346–354.
16. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms / D. Botstein [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1980. – Vol. 32. – P. 314–331.
17. Nei, M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W.H. Li // Proc Natl Acad Sci USA. – 1979. – Vol. 76. – P. 5269–5273.
18. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome / E. Silfverberg-Dilworth [et al.] // Tree Genetics & Genomes. – 2006. – Vol. 2. – P. 202–224.
19. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars / P. This [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 1448–1458.
20. Паспортизация сортов яблони на основе SSR-маркеров / О.Ю. Урбанович [и др.] // Доклады НАН Беларуси. 2008. – Т. 52. – № 5. – С. 93–99.
21. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple / A. Wunsch [et al.] // Scientia Horticulturae. – 2007. – Vol. 113. – P. 37–43.

Дата поступления статьи 10 апреля 2009 г.