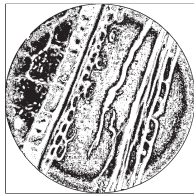


НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Институт генетики и цитологии

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

ТОМ **4**



Биотехнология
в селекции
растений
Геномика
и генетическая
инженерия

Минск
«Беларуская навука»
2014

УДК 631.52

Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск : Беларуская навука, 2014. – 653 с. – ISBN 978-985-08-1791-4.

Настоящий коллективный труд, подготовленный учеными Белорусского общества генетиков и селекционеров, выходит с 2008 г. и посвящен обобщению опыта применения генетических методов в совершенствовании частной селекции растений.

В четвертом томе отражены результаты исследований по разработке и применению маркер-сопутствующего отбора таких важных в хозяйственном отношении культур, как пшеница, ячмень, кукуруза, рожь, тритикале, соя, рапс, лен, томат, картофель, сахарная свекла, яблоня, груша, лесные и декоративные культуры. Показана возможность повышения эффективности отбора и ускорения селекции по хозяйственно ценным признакам у этих культур. Представлены результаты по использованию ДНК-маркеров для целей паспортизации культивируемых в Беларуси сортов растений. Также том включает материалы, отражающие состояние проблемы трансгеноза растений и пути генетической трансформации, и результаты научных исследований по разработке методов генетической трансформации и получению первичных трансгенных растений картофеля, льна, а также модельных растений табака и арабидопсиса.

Монография рассчитана на научных работников в области генетики и селекции растений, преподавателей и студентов биологических и сельскохозяйственных вузов, специалистов сельского хозяйства.

Табл. 145. Ил. 245. Библиогр.: 1550 назв.

Научные редакторы:

доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент НАН Беларуси А. В. Кильчевский,
доктор биологических наук, профессор, академик Л. В. Хотылева

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор, академик В. Н. Решетников,
доктор биологических наук, профессор, академик Н. А. Ламан

*Издание подготовлено при участии Белорусского общества генетиков
и селекционеров*

ISBN 978-985-08-1791-4 (т. 4)
ISBN 978-985-08-0990-2

© Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2014
© Оформление. РУП «Издательский дом «Беларуская навука», 2014

9.4. Молекулярно-генетический анализ полиморфизма подвидов льна культурного для идентификации генотипов с редкими ДНК-локусами

9.4.1. Оценка генетического разнообразия сортов льна с помощью RAPD и ISSR анализа

В настоящее время для идентификации сортов сельскохозяйственных культур применяются несколько типов молекулярных маркеров, которые различаются распределением по геному, уровнем выявляемого полиморфизма, специфичностью или универсальностью. Такие ДНК-маркерные системы, как RAPD (random amplified polymorphic DNA) и ISSR (inter-simple sequence repeat), широко и эффективно используются для выявления генетических связей на внутривидовом уровне льна культурного.

Метод RAPD основан на полиморфизме ДНК, выявляемом праймерами с произвольной последовательностью. Амплификация с неспецифичными праймерами позволила оценить вариабельность большого числа локусов и составить первую генетическую карту льна культурного [1]. RAPD-маркеры были использованы в определении полиморфизма близкородственных линий льна, полученных из

одного исходного сорта [2, 3]. С применением RAPD-анализа проведены исследования генетических взаимоотношений между видами рода *Linum* и определение таксономического статуса диких сородичей культурного льна [4–6]. На основе полиморфизма по RAPD-маркерам охарактеризованы мировые коллекции генетических ресурсов льна, которые позволили оценить распределение вариабельности в генофонде льна и уточнить вопросы о доместикации льна культурного [7–9]. RAPD-анализ использовали для генотипической дифференциации внутривидовых групп *L. usitatissimum*, ставшие результатом разнонаправленной селекции [10–14]. Ряд работ посвящен изучению местных стародавних сортов льна, которые характеризуется более высокой RAPD вариабельностью, чем генофонд культурных сортов, и являются одним из источников расширения разнообразия селекционного материала [15–17].

Метод ISSR основан на использовании микросателлитных повторов как участков отжига праймеров [18]. Амплификация с использованием ISSR-маркеров позволила провести исследование генетического разнообразия вида *L. bienne* Mill., родственного льну культурному [19]. ISSR-маркеры продемонстрировали свою эффективность в оценке генетического разнообразия при описании генофонда льна [20–23]. С помощью метода ISSR выявлены генетические различия между близкородственными генотипами растений-регенерантов и определена их принадлежность к соответствующим родительским растениям [24].

Лен культурный (*Linum usitatissimum* L.) – древнейшее сельскохозяйственное растение, широко используемое в различных отраслях промышленности. Разнонаправленная селекция во время одомашнивания привела к появлению двух типов льна в зависимости от получаемой продукции. Долгунцовый тип, или прядильный лен, используется для получения волокна. Масличный лен, объединяющий лен-межеумок, лен-кудряш и лен крупносемянный, выращивается ради семян. Выявление генетического полиморфизма внутривидовых групп subsp. *elongatum* Vav. et Ell., subsp. *usitatissimum* convar. *intermedium* Czernom., subsp. *usitatissimum* convar. *humile* Czernom., subsp. *mediterraneum* Vav. et Ell., subsp. *crepitans* Voenn. позволит оценить структуру генофонда льна культурного и отобрать селекционно значимые генотипы, несущие уникальные ДНК-локусы.

Материалом исследования служили 88 сортов льна культурного. Для оценки ДНК-полиморфизма подвидов льна культурного использовали 18 ISSR-маркеров, полиморфизм внутри subsp. *elongatum* Vav. et Ell. охарактеризовали на основании 18 RAPD-маркеров. Каждый RAPD-фрагмент и ISSR-фрагмент рассматривался как генетический локус. Различие между исследуемыми генотипами рассчитывали на основе матрицы сходства, построенной с применением невзвешенного парногруппового метода средних значений (UPGMA) программ (Statistica 7.0) и (Treecon).

Из 18 ISSR-праймеров, используемых в исследовании подвидов льна, информативными оказались 17, праймер ISSR-07 не выявил различий между изучаемыми генотипами. Учитывали 283 амплифицированных фрагмента, из них 205 были полиморфными. Основная зона распределения фрагментов находится в диапазоне 180–2000 п. н.

Число фрагментов, полученных при амплификации ДНК подвидов льна с каждым из использованных праймеров, варьирует от 8 (ISSR-08a, ISSR-09) до 25 (ISSR-24). Количество полиморфных фрагментов в зависимости от праймера изменялось от 5 (ISSR-08a) до 17 (ISSR-23, ISSR-24), в среднем выявлено 12 полиморфных локусов на праймер. Уровень полиморфизма, рассчитанный как отношение числа полиморфных полос к общему числу детектируемых полос, находился в пределах 28,6–84,2% и в среднем составил 72,4%. Для 5 праймеров отмечен наиболее высокий уровень полиморфизма 87,5–100% (табл. 9.14).

Таблица 9.14. Характеристика полиморфных праймеров, используемых для ISSR-маркирования подвидов льна культурного (*Linum usitatissimum* L.)

Название праймера	Последовательность праймера, 5'-3'	Общее число детектируемых полос	Число полиморфных полос	Уровень полиморфизма, %
ISSR-02	(cag)5	18	16	88,9
ISSR-04	(ac)8ag	18	14	77,8
ISSR-04a	(ga)8yc	16	10	62,5
ISSR-05	(ag)8g	14	7	50,0
ISSR-06	(ga)8t	12	7	58,3
ISSR-07	(ac)8yt	19	16	84,2
ISSR-08a	(gt)8yc	8	5	62,5
ISSR-09a	(ctc)6a	20	16	80,0
ISSR-10	(gaa)6	14	4	28,6
ISSR-11	(ag)8c	16	14	87,5
ISSR-12	(ac)8c	12	6	50,0
ISSR-17	(gaca)4	17	14	82,4
ISSR-17a	(agc)6g	17	16	94,1
ISSR-18	(agc)6c	17	15	88,2
ISSR-22	(ac)8aa	15	11	73,3
ISSR-23	(ac)8ta	17	17	100,0
ISSR-24	(ac)8tc	25	17	68,0

Все праймеры (кроме ISSR-09 и ISSR-10) выявили у исследуемых сортов уникальные (встречающиеся только у одного сорта изучаемой коллекции) фрагменты. Наибольшее количество уникальных локусов в анализируемой выборке было выявлено при помощи ISSR-18 (18 локусов) и ISSR-11 (17 локусов).

Наибольшее генетическое расстояние по Nei [25] между подвидами льна культурного составило 30%, что свидетельствует о высоком уровне полиморфизма. Внутри подвидов наиболее разнородной группой является лен крупносемянный. Среднее значение гетерогенности составило 20%, максимальное – 25% (наиболее удалены генотипы K-1210, Sel. of Clli-1856, NF-115, Endress Olajlen). Высокий уровень гетерогенности отмечен также внутри подвида лен расстрескивающийся, у которого среднее значение полиморфизма составило 18%, а наибольший уровень полиморфизма (31%) отмечен между образцами K-5057 – Grandal, последний из которых содержал большое количество уникальных фрагментов. Наличие множества уникальных локусов в генотипах крупносемянного и расстрескивающегося льнов подтверждает высокую гетерогенность этих подвидов.

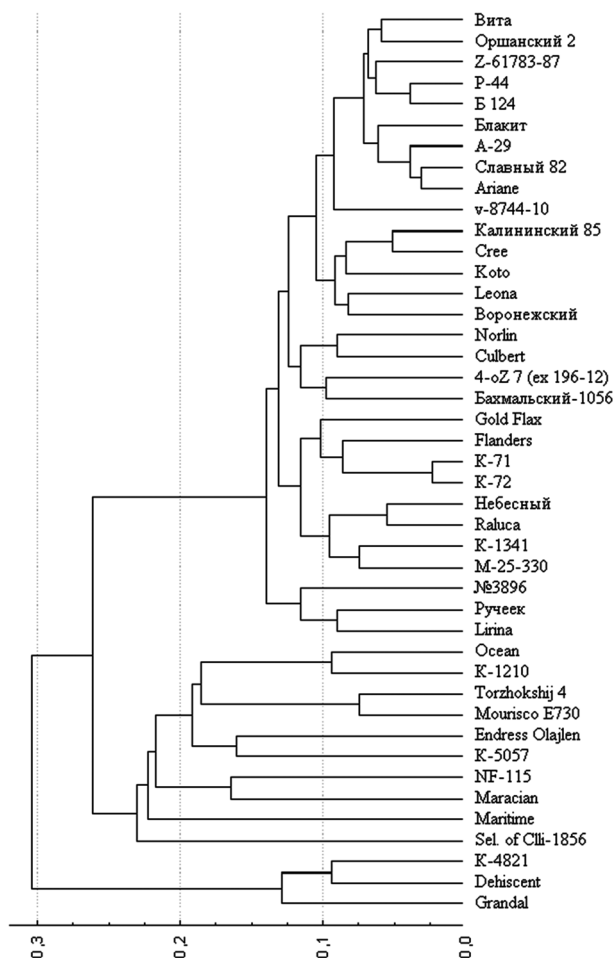


Рис. 9.21. Дендрограмма генетической гетерогенности подвидов льна культурного, выполненная по данным ISSR-анализа

Подвиды лен-межеумок и лен-кудряш сравнимы по уровню внутригруппового полморфизма, который составляет 13% (наиболее полиморфны Leona, № 3896, Ручеек, Бахмальский-1056). Анализ матрицы генетических расстояний позволил установить, что наиболее однородной группой являются сорта подвида лен-долгунец. Среднее значение полиморфизма внутри этой группы составило 8%. Самыми генетически разнородными в этой группе являются генотипы Z-61783-87, v-8744-10, Калининский 85.

Методом кластерного анализа подвиды льна культурного были сгруппированы в два кластера (рис. 9.21). Первый кластер объединил сорта льна растрескивающегося K-4821, Grandal, Dehiscent, второй был разделен на два субкластера, один из которых включил сорта льна крупносемянного и растрескивающегося, другой объединил генотипы подвидов лен-долгунец, лен-межеумок и лен-кудряш. Внутри второго субкластера в отдельную группу выделились сорта льна-долгунца, подвиды лен-межеумок и лен-кудряш составили одну смешанную группу.

Таким образом, в результате молекулярного анализа ISSR-локусов льна культурного выявлены уникальные в исследуемой коллекции ДНК-спектры, которые маркируют сорта с различными хозяйственно важными признаками. Использование в селекционных программах полиморфного исходного материала позволит расширить генетический базис культивируемых сортов. Несмотря на то, что лен-долгунец образует в значительной степени однородную группу, более детальное изучение сортов льна-долгунца позволит идентифицировать относительно удаленные генотипы, использование которых в селекционном процессе может оказать положительное влияние на продуктивность.

Оценку молекулярно-генетической гетерогенности сортов льна-долгунца проводили на основе RAPD-анализа. Использовали 18 произвольных праймеров, из которых информативностью обладали 10 праймеров: ОРА-04, ОРА-14, ОРА-20, ОРВ-03, ОРВ-14, ОРВ-19, UBC-417, UBC-586, UBC-818, ОРВ-11. Получено 65 ампликонов, из них полиморфным оказался 41 локус (табл. 9.15). Основная зона разделения фрагментов расположена в диапазоне от 300 до 1500 п. н.

Таблица 9.15. Характеристика полиморфных RAPD-праймеров, используемых для маркирования сортов льна-долгунца

Название праймера	Последовательность праймера, 5'-3'	Общее число детектируемых полос	Число полиморфных полос	Уровень полиморфизма, %
ОРА-04	AATCGG GCT G	9	5	55,6
ОРА-14	TCT GTG CTG G	10	3	30,0
ОРА-20	GTT GCG ATC C	6	6	100,0
ОРВ-03	CAT CCC CCT G	3	1	33,3
ОРВ-14	TCC GCT CTG G	4	2	50,0
ОРВ-19	ACC CCC GAA G	5	4	80,0
UBC-417	GAC AGG CCA A	7	2	28,6
UBC-586	CCG GTT CCA G	9	6	66,7
UBC-818	CACACACACACACAG	5	5	100,0
ОРВ-11	CTG ATG CGT G	7	7	100,0

Число фрагментов, полученных при амплификации ДНК с каждым из использованных праймеров, варьирует от 3 (ОРВ-03) до 10 (ОРА-14), количество полиморфных фрагментов в зависимости от праймера изменялось от 1 (ОРВ-03) до 7 (ОРВ-11). Для праймеров ОРА-20, UBC-818, ОРВ-11 характерен максимальный уровень полиморфизма, рассчитанный как отношение числа полиморфных полос к общему числу детектируемых полос.

Установлено варьирование межсортового полиморфизма по всем праймерам от 10 до 61% со средним значением 23,8%. По отдельным праймерам уровень полиморфизма достигал 100% (праймер ОРА-20, сорта Belinka, Bison). Наибольшее число полиморфных локусов обнаружено у сортов Belinka (Голландия), Bison (США), Silva (Чехия), Vega (Чехия), Л-41 (Беларусь).

Согласно результатам кластерного анализа, представленное разнообразие сортов льна-долгунца имеет сложную иерархию (рис. 9.22). Всего сформировано

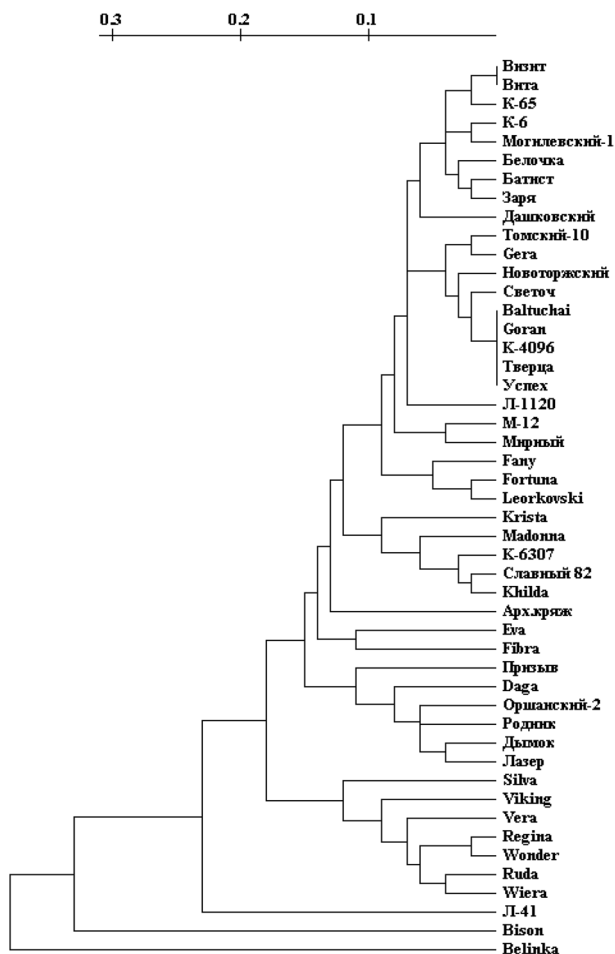


Рис. 9.22. Дендрограмма генетической гетерогенности сортов льна-долгунца, полученная по данным RAPD-анализа

два кластера, первый, наиболее обширный кластер составили образцы 8 эколого-географических групп. Тесную взаимосвязь современных сортов льна-долгунца различных регионов мира можно объяснить происхождением от небольшого количества первоначальных форм. Сорта российской и белорусской селекции выделялись в отдельные группы в пределах самого крупного кластера. Пять сортов, различного географического происхождения образовали гомогенную группу, в пределах которой используемые праймеры полиморфизма не выявили. Аналогично не были дифференцированы сорта Визит и Вита. Возможно, использованные маркеры не затрагивают дивергентные части генома этих образцов, что не позволило провести их генетическую дифференциацию. Второй кластер составили 7 сортов зарубежной селекции из Чехии, Франции, Голландии, США. Для этой группы характерно наличие ДНК-локусов, не представленных среди генотипов первой группы (получены при использовании праймеров ОРА-20, ОРВ-03, ОРА-04, ОРВ-14), в том числе у образцов белорусской селекции. Сорта Л-41, Bison, Belinka

оказались наиболее дивергентными и сформировали внешние ветви при кластеризации.

Полученные данные свидетельствуют о высоком генетическом сходстве исследуемых образцов. Однако результаты RAPD-анализа позволяют идентифицировать относительно удаленные генотипы и рекомендовать для использования в селекционном процессе сорта различного географического происхождения. Сорта зарубежной селекции Belinka, Bison, Vera, Ruda, Silva, Regina, Madonna, Wiera, Viking и Wonder характеризуются наличием ДНК-локусов, не свойственных белорусской популяции льна. Сорта белорусской селекции Оршанский-2, К-65, Дашковский, Могилевский, Родник распределены по разным ветвям дендрограммы, что позволяет предположить генетическую дивергенцию, несмотря на происхождение из одного региона.

9.4.2. Сравнительная оценка генетического разнообразия современных сортов и белорусских ландрас льна с помощью RAPD-анализа

В последние десятилетия все большее внимание уделяется описанию и сохранению генетического разнообразия. Главные его источники, по мнению ряда ученых [26–29], сосредоточены в местных сортах и популяциях, сохраняемых в коллекциях генбанков. Изучение местных сортов может не только дать полную картину генетического разнообразия культурного вида, которое в сортах современной селекции весьма ограничено, но и позволить выявить генотипы, интересные в качестве доноров редких аллелей генов хозяйственно значимых признаков.

Для получения полной информации о генетической структуре растительных ресурсов необходимо проводить оценку генотипов не только по морфологическим признакам, но и с привлечением ДНК-маркеров. Анализ генетических ресурсов растений по молекулярным маркерам позволяет выявлять скрытую изменчивость и тем самым целенаправленно подходить к более точной дифференциации и идентификации коллекционных образцов, в том числе и выявлению ценных генотипов.

При проведении RAPD-ПЦР использовали 19 произвольных праймеров, с помощью которых оценивали межсортовое генетическое разнообразие льна (*Linum usitatissimum* L.). Исследования выполнены на 20 сортах льна-долгунца современной селекции (Оршанский 2, Могилевский, Белинка, Дашковский, Родник, Балтучай, Нива, К-65, Е-68, М-12, Лира, Лаура, Згода, Весна, Вита, Прамень, Василек, Пралеска, Старт, Блакит) и 11 белорусских стародавних сортах (к-37, к-594, к-790, к-1042, к-4219, к-5330, к-5453, к-5451, к-5991, к-6212, к-6601).

В табл. 9.16 приведены код, нуклеотидные последовательности праймеров, использованных при изучении межвидового генетического разнообразия льна, и количество ампликонов, полученных с каждым из праймеров. Отмечены существенные различия по количеству RAPD-фрагментов между изученными сортами. Исследуемые образцы различались также по числу уникальных (характерных только для одного сорта) ампликонов. Мы считали, что каждая полоса

Таблица 9.16. Характеристика эффективных RAPD-праймеров, использованных для анализа коллекции сортов и ландрас льна-долгунца

Праймер	Последовательность 5'-3'	Общее число амплифицированных фрагментов	Количество полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %
UBC 73	GGG CAC GCG A	8	2	25
UBC 127	ATC TGG CAG C	10	4	40
UBC 248	GAG TAA GCG G	9	3	33,3
UBC 290	CCG CGA GCA C	5	1	20
UBC 292	AAA CAG CCC G	7	6	85,7
UBC 336	GCC ACG GAG A	7	1	14,3
UBC 337	TCC CGA ACC G	5	2	40
UBC 348	CAC GGC TGC G	4	3	75
UBC 365	TAG ACA GAG G	8	5	62,5
UBC 396	GAA TGC GAG G	6	3	50
UBC 417	GAC AGG CCA A	5	2	40
UBC 542	CCC ATG GCC C	10	6	60
UBC 574	GCC AGA CAA G	6	3	50
UBC 586	CCG GTT CCA G	7	1	14,3
UBC 731	CCC ACA CCA C	7	4	57,1
UBC 153	GAG TCA CGA G	9	4	44,4
UBC 180	GGG CCA CGC T	6	3	50
A 12	TCGGCGATAG	10	4	40
W 13	CACAGCGACA	6	2	33,3
Всего		135	60	

RAPD представляет уникальный генетический локус. Наличие полосы RAPD интерпретировалось либо как гетерозигота, либо как доминантная гомозигота, а отсутствие ее – как рецессивная гомозигота.

Основная зона разделения фрагментов находилась в пределах 2000–200 п. н. В целом учитывалось 135 амплифицированных продуктов (среднее число локусов на праймер 7,1), из них 60 (44%) были полиморфными. Из 60 полиморфных ПЦР-маркеров в 33 сортах некоторые могли обнаруживаться в сортах часто, а другие редко. Так, например, 24 полиморфные полосы (40%) встречались в большинстве из 33 образцов (частота появления 0,9 и выше), а 11 полиморфных полос (18%) обнаруживались лишь в нескольких сортах (частота появления 0,1 и ниже). Такой характер изменчивости RAPD-локусов преимущественно и наблюдается в культурных сортах, поскольку в результате селекции фиксируются как доминантные, так и рецессивные аллели [30]. Некоторые праймеры выявили уникальные, присущие только одному конкретному сорту ампликоны: у сортов Блакит – *UBC180₆₀₀*, Старт – *UBC292₁₆₀₀*, Прамень – *UBC365₉₀₀*, *UBC365₆₅₀*, к-5451 – *A12₁₈₀₀*. Эти уникальные ампликоны могут использоваться для сортовой идентификации генотипов.

Наблюдалось широкое варьирование генетического полиморфизма в зависимости от праймера – от 14,3 до 85,7% (в среднем 41,7%). Довольно низкий уровень полиморфизма характерен для самоопыляющихся видов, включая лен, хотя

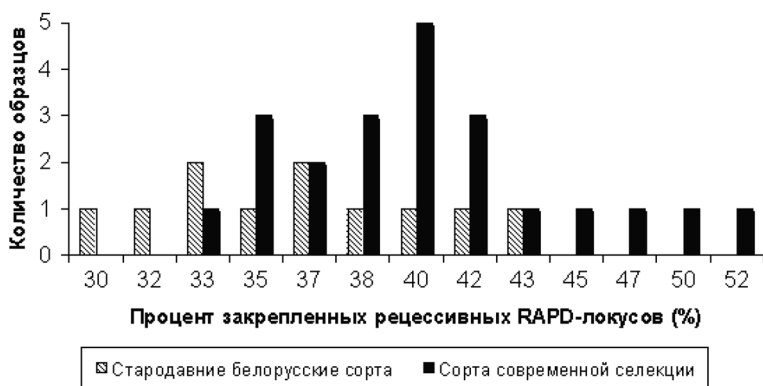


Рис. 9.23. Процент закрепленных рецессивных RAPD-локусов у исследованных белорусских сортов и ландрас льна

есть указания на то, что для льна межсортовой полиморфизм выше, чем для других культур, и составляет 40% [31–34].

Поскольку каждый образец ДНК был представлен смесью десяти растений, отсутствие полосы RAPD в локусе также означало бы фиксацию рецессивного аллеля у сорта (при частоте рецессивного аллеля выше, чем $0,9974 (0,95^{1/2n})$, где n – количество использованных растений) [35]. Большая доля фиксированных рецессивных локусов указывает на более низкую генетическую вариабельность данного сорта по сравнению с прочими сортами коллекции. Таким образом, подобное измерение может служить простым средством сравнения генетической изменчивости по RAPD-маркерам в различных образцах и при этом не требуется проводить оценку частоты аллелей.

Пропорцию закрепленных рецессивных RAPD-локусов подсчитывали отдельно для сортов современной селекции и для стародавних сортов (рис. 9.23). У современных сортов эта пропорция варьировала от 33,0 до 51,7% (в среднем 40,4%), у стародавних – от 30 до 43,3% (в среднем 36,3%). Аналогичную картину наблюдали Y. B. Fu et al. при изучении 54 американских сортов льна масличного [10]. Доля закрепленных рецессивных RAPD-локусов в американских сортах колебалась от 36,9 до 59,2% и составляла в среднем 45,3%. Эта средняя доля зафиксированных локусов была ниже, чем в растениях других сортов льна из коллекции Генетических ресурсов растений Канады (51,2% у сортов льна-долгунца), но выше, чем у североамериканских ландрас (42,7%), и была сравнима с долей закрепленных рецессивных RAPD-локусов в мировой коллекции льна (45,8%) [10, 17].

Наибольший процент закрепленных рецессивных RAPD-локусов выявлен у сортов Родник – 52%, Лира – 47% и Згода – 50%.

С целью измерения генетического разнообразия сортов льна, возделываемых на территории Беларуси с 1922 г., вычисляли линейную регрессию долей фиксированных рецессивных RAPD-локусов за годы внедрения. Регрессия доли закрепленных рецессивных RAPD-локусов за годы выборки (рис. 9.24) характеризуется коэффициентом линейной регрессии 0,087 (доля локусов на год) и статистически достоверно не отличается от нуля ($p > 0,26$).



Рис. 9.24. Взаимосвязь между пропорцией закрепленных рецессивных RAPD-локусов и годом регистрации сорта льна

Линейная зависимость между долей фиксированных рецессивных RAPD-локусов и годом выборки белорусских сортов, внедренных с 1922 по 2004 г., не выявлена.

Для количественной оценки RAPD-полиморфизма и определения уровня дивергенции между изученными образцами льна полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в RAPD-спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно. По матрицам состояний были рассчитаны матрицы различий с использованием коэффициента Жаккарда [36].

Значение коэффициента дистанции между стародавними белорусскими образцами к-6212 и к-6601, а также между к-6601 и сортом льна-долгунца Л1120 не превысило 0,024, что указывает на определенное сходство генетических структур данных видов. Наибольшее значение коэффициента генетической дистанции Жаккарда среди изученных образцов было найдено между стародавним белорусским образцом к-1042 и голландским сортом льна-долгунца Belinka, а также между к-1042 и сортом Старт, и составило 0,606 и 0,622 соответственно.

Исходя из матрицы состояний бинарных признаков, невзвешенным парно-групповым методом кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) была построена дендрограмма генетического подобия между изученными образцами льна-долгунца (рис. 9.25).

Достоверность полученного нами набора данных была оценена с помощью стандартного метода бутстрепов. Согласно топологии дендрограммы сорта современной селекции Родник и Старт, а также стародавние белорусские сорта долгунцового типа к-1042 и к-37 формируют отдельные ветви, что указывает на их генетическую обособленность от других форм. Остальные исследованные сорта распределены в два основных кластера (I, II). Основная масса сортов находится в кластере I. Необходимо отметить, что почти все исследованные белорусские стародавние сорта, за исключением к-1042, к-37 и к-594, группируются

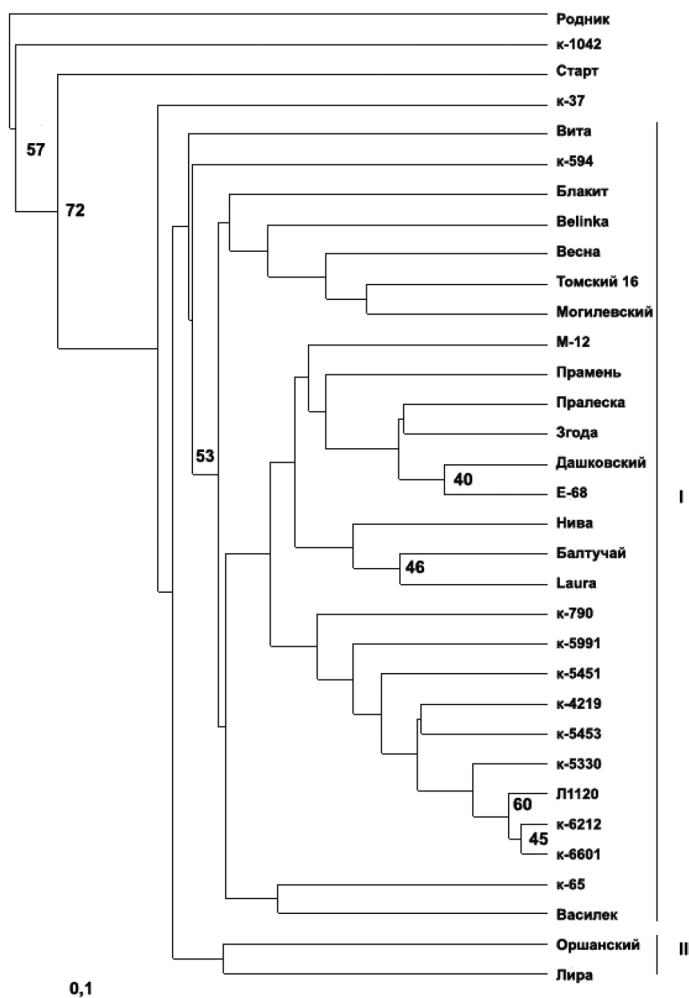


Рис. 9.25. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между сортами льна-долгунца современной селекции и белорусскими стародавними сортами, построенная на основании анализа генетических дистанций. Цифрами внутри ветвей обозначены значения бутстрэпа

в отдельный подкластер, к которому относится также сорт Л1120. В кластере II группируются только два среднеспелых сорта современной белорусской селекции Оршанский 2 и Ли́ра, что может свидетельствовать об их генетическом сходстве.

9.4.3. Оценка генетического разнообразия сортов льна с помощью SSR-анализа

Лен принадлежит к числу сельскохозяйственных культур, для которых характерен довольно низкий уровень полиморфизма, что является следствием самоопыления и ограниченного числа источников, используемых при создании современных сортов. RAPD-маркеры дают возможность достоверно дифференци-

ровать дикие виды [5, 6, 17, 37] и сорта льна масличного [10, 13, 38], но возникают трудности с идентификацией сортов льна-долгунца. В определенной степени это обусловлено недостаточно высокой разрешающей способностью RAPD-метода. Для более точного выявления полиморфизма близкородственных генотипов льна используется метод анализа микросателлитных последовательностей ДНК (SSR-PCR), с помощью которого возможно выявить некоторые дополнительные особенности геномов ряда масличных и долгунцовых сортов льна. Тогда как полиморфизм, выявляемый с помощью RAPD-маркеров, обеспечивается мутационными изменениями в сайтах отжига случайных праймеров (а уровень данных изменений внутри вида *Linum usitatissimum* L., очевидно, низок), полиморфизм SSR-последовательностей основывается на изменчивой природе самих микросателлитных локусов.

9.4.3.1. Оценка полиморфизма SSR-локусов сортов льна различной селекционной направленности и географического происхождения

При создании системы маркеров на основе микросателлитных локусов ДНК первоначальным этапом работы является проведение предварительных экспериментов по оптимизации методики ПЦР-анализа и подбору эффективных высокополиморфных маркеров. С этой целью нами проведен анализ восьми сортов льна-долгунца: Славный 82, Светоч, Томский 16 (Россия), Прамень, Форт, Вита, Старт (Беларусь), Luna (Польша); шести сортов льна масличного: Ручеек, Небесный (Россия), Gold Flax, Lola (Чехия), Bison (США), Alaska (Франция) и одной ландрасы: Lipinska (Польша) по геномным SSR-маркерам, впервые разработанным для льна С. Roose-Amsaleg et al. [38].

Из 23 проанализированных пар праймеров полиморфными среди образцов коллекции оказались 20 пар (87,0%) (табл. 9.17). В целом с помощью 20 эффективных пар праймеров выявлено 22 полиморфных локуса, которые были использованы для создания SSR-базы данных изученных сортов льна. Число обнаруженных аллелей на локус варьировало от 2 до 7, при этом 11 из 22 локусов были биаллельными.

Полученная SSR-база данных позволила провести анализ генетического сходства изученных форм льна и построить дендрограмму генетического подобия методом невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) (рис. 9.26).

Исследованные генотипы сформировали три кластера. Обособленно расположены сорта льна-долгунца: белорусский Форт и российские Славный 82 и Светоч. Из них Светоч более близок кластеру, объединившему современные сорта долгунцов белорусской селекции Старт и Прамень с российским сортом Томский 16. В середине дендрограммы расположен кластер, состоящий из трех генотипов: сорт белорусской селекции Вита и два образца польского происхождения (сорт льна-долгунца Luna и ландраса долгунцового типа Lipinska XIII). Исходя из представленных результатов молекулярного анализа, ландраса Lipinska XIII генетически ближе к сортам льна масличного. В третьем кластере находятся сорта льна

Таблица 9.17. Характеристика полиморфных SSR-локусов льна, выявленных при анализе генотипов с 23 парами праймеров

Полиморфный локус	Аллели	PIC
<i>Lu1</i>	237, 239, 241, 245	0,617
<i>Lu2</i>	213, 215, 217	0,426
<i>Lu3</i>	156, 158	0,484
<i>Lu4</i>	171, 175	0,133
<i>Lu8</i>	197, 199, 203, 205, 209, 211, 213	0,703
<i>Lu11</i>	301, 305	0,124
<i>Lu12A</i>	251, 253, 255	0,320
<i>Lu12B</i>	245, 247	0,121
<i>Lu13</i>	374, 376, 378, 380, 384	0,768
<i>Lu15</i>	197, 206	0,499
<i>Lu17</i>	273, 281, 283, 285, 287, 289	0,630
<i>Lu19</i>	144, 145	0,031
<i>Lu21</i>	209, 214, 217	0,512
<i>Lu23</i>	246, 248, 250, 252, 254	0,731
<i>Lu28</i>	178, 187	0,465
<i>Lu29</i>	175, 184	0,291
<i>Lu31</i>	136, 138, 141	0,551
<i>Lu32A</i>	249, 252, 263	0,227
<i>Lu32B</i>	113, 223	0,375
<i>Lu36</i>	182, 190	0,208
<i>Lu37</i>	256, 259	0,432
<i>Lu38</i>	141, 143, 147	0,608
Среднее		0,421

масличного, сгруппированные вместе. Все шесть сортов отличаются друг от друга. Сравнительный SSR-анализ геномов позволил нам дифференцировать изученные долгунцовые и масличные сорта на несколько групп (кластеров). Наиболее близкими друг к другу оказались российские сорта льна-долгунца Томский 16 и современные белорусские долгунцовые сорта Старт и Прамень. К ним при-мыкает также российский сорт долгунца Светоч. Выявленное сходство гено-мов современных белорусских сортов Старт и Прамень с российскими сортами Томский 16 и Светоч, вероятно, является следствием их генетического родства и общей селекционной истории.

Известно, что сорт Светоч в 1960-х гг. являлся эталонным по качеству волокна, затем его сменил белорусский сорт Оршанский 2. Сорт Томский 16 был эта-лоном по скороспелости и передан в 1980-х гг. для районирования в Беларусь [39]. В то же время белорусский сорт Форт и российский сорт Славный 82 удалены от остальных сортов и, вероятно, имеют иное селекционное происхождение. Известно, что в формировании сорта Форт принимал участие сорт голландской селекции *Belinka* [40].

Долгунцовые сорта белорусской (Вита) и польской (*Luna*) селекции, а также ландраса долгунцового типа польского происхождения *Lipinska XIII* объедине-

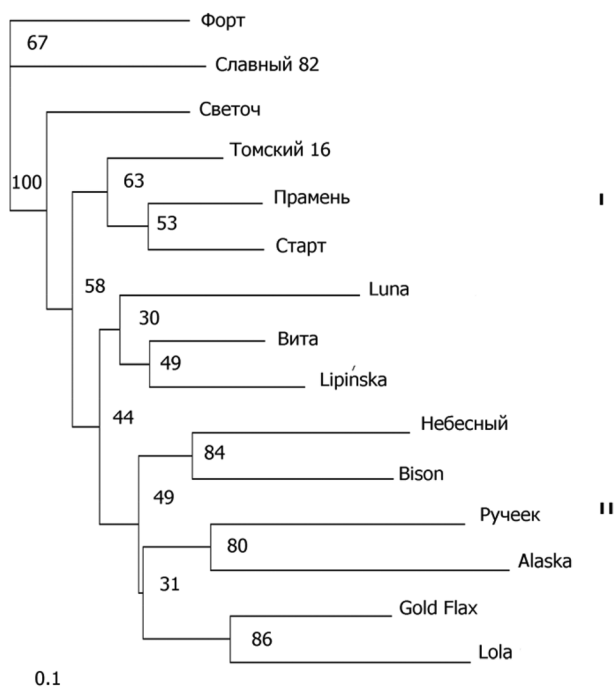


Рис. 9.26. Дендрограмма генетического подобия сортов льна, различного происхождения и селекционной направленности, построенная по результатам SSR-анализа: I – сорта льна-долгунца, II – сорта льна масличного. Цифрами внутри ветвей обозначены значения бутстрепа

ны в отдельный кластер. Это позволяет предположить, что ландраса участвовала в формировании этих двух современных сортов.

Изученные масличные сорта объединились в самостоятельный кластер. При этом генетически близкие сорта льна-долгунца Вита, Luna и ландраса Lipinska XIII оказались ближе, чем остальные сорта долгунцов к масличным льнам. Это предполагает участие масличных льнов в их селекционной истории, что согласуется с данными о более раннем происхождении масличных сортов [37, 41]. Исходя из представленных результатов и с учетом того, что генотип польской ландрасы долгунцового типа ближе по аллельному составу к сортам масличного льна, ландрасу Lipinska XIII можно классифицировать как лен-межеумок.

Возможно, сорта Вита и Luna в определенных экологических условиях также способны проявить свою двойственность и могут использоваться для получения не только льноволокна, но и масла. Дополнительным аргументом, подтверждающим это предположение, может служить выявленный более высокий полиморфизм гетерохроматических районов сортов Luna, Вита и Lipinska XIII, который, как полагают, коррелирует с генетической пластичностью.

В целом использованная система маркеров выявила невысокий уровень полиморфизма (среднее значение PIC = 0,421) и для дальнейших исследований были отобраны микросателлитные маркеры со значением PIC выше среднего уровня, а также набор маркеров был расширен в связи с разработкой новых высокополиморфных SSR-маркеров для льна X. Deng et al. [42].

9.4.3.2. Оценка полиморфизма SSR-локусов сортов льна масличного

Материалом для исследований служил 31 сорт льна масличного (*L. usitatissimum* L., convar. *humile* Mill.) различного эколого-географического происхождения, отличающиеся составом жирных кислот.

Анализ полиморфизма проводили с использованием 12 пар SSR-праймеров. Размер и количество аллелей, обнаруженные для каждого локуса, а также расчетные показатели, отражающие генетическое разнообразие сортов, приведены в табл. 9.18. Используемая система маркеров выявила достаточно высокие показатели информационного содержания.

Таблица 9.18. Показатели полиморфизма 12 SSR-локусов льна масличного

Локус	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер аллелей, п. н.	PIС	Число редких аллелей
<i>Lu15</i>	(CAT)8	4	195–217	0,693	0
<i>Lu3</i>	(GT)11	5	158–196	0,601	0
<i>Lu8</i>	(AG)24	5	127–217	0,706	0
<i>Lu21</i>	(GA)15A4	4	165–227	0,694	0
<i>Flu8</i>	(TTC)12TTT(TTC)22TTT(TTC)7	4	107–116	0,612	0
<i>Flu7</i>	(TTC)21	6	140–160	0,754	1
<i>Flu9</i>	(TTC)17	4	105–117	0,641	1
<i>Flu11</i>	(TTC)21	5	106–117	0,776	0
<i>Flu24</i>	(TTC)13	8	100–154	0,768	3
<i>Flu25</i>	(TTC)22TTTTTT(TTC)7	15	160–230	0,905	7
<i>Flu10</i>	(TTC)10	9	143–180	0,740	6
<i>Flu21</i>	(TTC)4T(TTC)18	9	143–180	0,746	6
Итого		78			24
Среднее на локус		6,5		0,720	2,0

Частота встречаемости различных аллелей 12 микросателлитных локусов в изученной выборке варьировала от 1,6 до 67,7%. При этом подавляющее большинство аллелей встречалось с частотой менее 50%.

По результатам исследования полиморфизма двенадцати SSR-локусов масличного льна выполнен кластерный анализ. Как видно из представленной на рис. 9.27 дендрограммы, все исследованные сорта распределены в два основных кластера (отмечены римскими цифрами). Основная масса сортов находится в кластере I, объединяясь в смешанные группы. В отдельный подкластер III сгруппированы все низколиноленовые сорта независимо от страны происхождения.

В кластере I можно также выделить пары сортов одинакового географического происхождения, которые кластеризовались вместе с высокими (более 70%) значениями бутстрепа: Спартак и 3871 (Россия); Abyssinian и Talba (Эфиопия); NP-55 и Nameless (K-180) (Индия). Кластер II представлен сортами американского континента: из США и Аргентины.

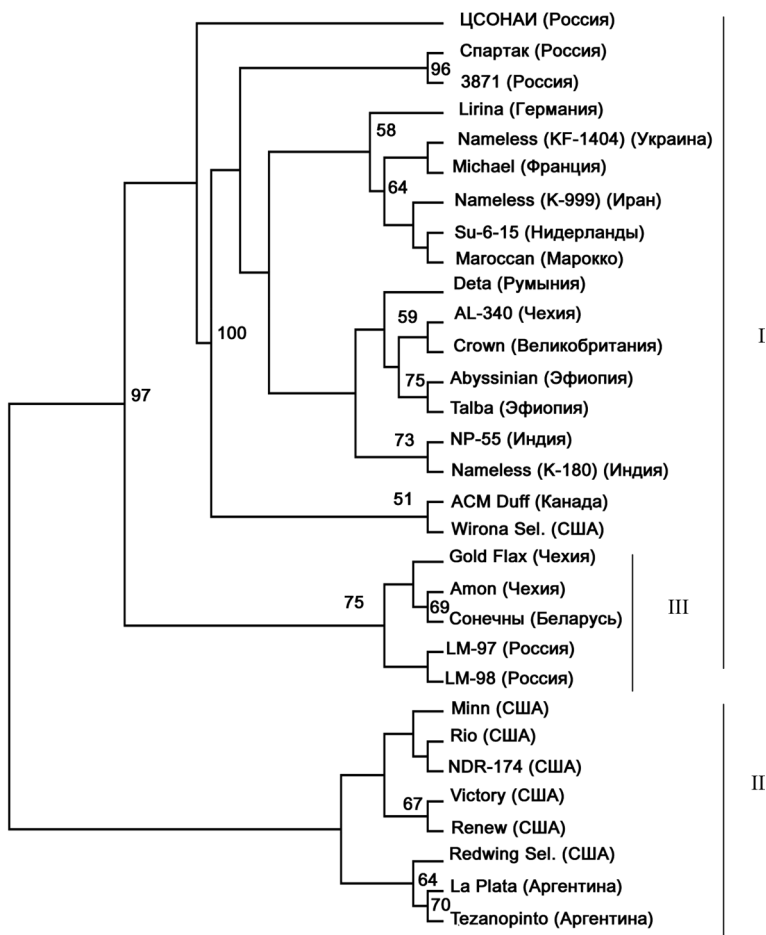


Рис. 9.27. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между сортами масличного льна, построенная на основании анализа генетических дистанций. Цифрами внутри ветвей обозначены значения бутстрепа

9.4.3.3. Оценка полиморфизма SSR-локусов сортов льна-долгунца, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь, и стародавних белорусских сортов

Материал исследования был представлен выборкой из 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь, а также выборкой из 15 стародавних белорусских сортов льна.

Анализ полиморфизма микросателлитных локусов сортов льна проводили с использованием 18 пар SSR-праймеров, из которых 16 пар являются монолокусными. Пары праймеров *Lu15* и *Flu21* выявили по 2 локуса.

Размер и количество аллелей, обнаруженные для каждого локуса, а также расчетные показатели, отражающие генетическое разнообразие сортов, приведены в табл. 9.19. Частота встречаемости различных аллелей 20 микросателлитных

Таблица 9.19. Результаты оценки полиморфизма SSR-локусов у 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр Республики Беларусь

Лocus	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер аллелей, п. н.	PIC	Число редких аллелей
<i>Lu2</i>	(TC) ₁₈	6	206–226	0,753	2
<i>Lu4</i>	(GA) ₉	9	156–180	0,786	4
<i>Lu13</i>	(AC) ₄ (AG) ₁₈	12	360–396	0,869	5
<i>Lu15a</i>	(CAT) ₈	8	100–127	0,690	5
<i>Lu15b</i>	(CAT) ₈	9	189–226	0,789	4
<i>Lu3</i>	(GT) ₁₁	7	156–172	0,807	2
<i>Lu8</i>	(AG) ₂₄	10	195–246	0,801	6
<i>Lu21</i>	(GA) ₁₅ A ₄	8	210–252	0,754	3
<i>Lu17</i>	(GA) ₂₆	9	273–291	0,777	5
<i>Lu23</i>	(CA) ₈ (GA) ₂₂	10	240–262	0,862	3
<i>Lu28</i>	(TCT) ₈	6	175–193	0,789	0
<i>Flu8</i>	(TTC) ₁₂ TTT(TTC) ₂₂ TTT(TTC) ₇	9	166–211	0,752	5
<i>Flu7</i>	(TTC) ₂₁	7	141–161	0,808	2
<i>Flu9</i>	(TTC) ₁₇	5	103–115	0,708	1
<i>Flu11</i>	(TTC) ₂₁	4	103–112	0,523	2
<i>Flu24</i>	(TTC) ₁₃	3	97–106	0,539	0
<i>Flu25</i>	(TTC) ₂₂ TTTTTT(TTC) ₇	11	179–229	0,832	5
<i>Flu10</i>	(TTC) ₁₀	9	141–164	0,711	4
<i>Flu21a</i>	(TTC) ₄ T(TTC) ₁₈	5	100–112	0,575	2
<i>Flu21b</i>	(TTC) ₄ T(TTC) ₁₈	9	140–164	0,756	5
Итого		156			65
Среднее на locus		7,8 ± 0,531		0,744 ± 0,022	3,25

Таблица 9.20. Результат оценки полиморфизма SSR-локусов у 15 стародавних белорусских сортов льна

Лocus	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер аллелей, п. н.	PIC	Число редких аллелей
<i>Lu2</i>	(TC) ₁₈	8	198–218	0,751	5
<i>Lu4</i>	(GA) ₉	6	164–178	0,664	4
<i>Lu13</i>	(AC) ₄ (AG) ₁₈	10	362–392	0,756	7
<i>Lu15a</i>	(CAT) ₈	6	100–118	0,771	2
<i>Lu15b</i>	(CAT) ₈	6	189–216	0,809	1
<i>Lu3</i>	(GT) ₁₁	6	156–166	0,776	2
<i>Lu8</i>	(AG) ₂₄	8	189–215	0,813	4
<i>Lu21</i>	(GA) ₁₅ A ₄	6	210–220	0,796	1
<i>Lu17</i>	(GA) ₂₆	8	269–291	0,798	3
<i>Lu23</i>	(CA) ₈ (GA) ₂₂	8	238–258	0,820	3
<i>Lu28</i>	(TCT) ₈	5	175–190	0,744	1
<i>Flu8</i>	(TTC) ₁₂ TTT(TTC) ₂₂ TTT(TTC) ₇	15	142–205	0,916	11

Локус	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер аллелей, п. н.	PIC	Число редких аллелей
<i>Flu7</i>	(TTC) ₂₁	7	139–156	0,831	2
<i>Flu9</i>	(TTC) ₁₇	5	103–115	0,720	2
<i>Flu11</i>	(TTC) ₂₁	5	100–112	0,682	1
<i>Flu24</i>	(TTC) ₁₃	2	97–100	0,480	0
<i>Flu25</i>	(TTC) ₂₂ TTTTTT(TTC) ₇	16	158–238	0,918	13
<i>Flu10</i>	(TTC) ₁₀	8	144–165	0,842	3
<i>Flu21a</i>	(TTC) ₄ T(TTC) ₁₈	3	100–106	0,624	0
<i>Flu21b</i>	(TTC) ₄ T(TTC) ₁₈	5	144–156	0,776	1
Итого		143			66
Среднее на локус		7,15 ± 0,762		0,764 ± 0,022	

локусов в изученной выборке варьировала от 1,3 до 61,5%. Изученная выборка 39 сортов характеризовалась высокой частотой встречаемости редких аллелей – 41,7%, т. е. 65 аллелей из 156 в данной выборке были редкими и встречались с частотой менее 5% (табл. 9.19).

Аналогичный подход был использован для выборки из 15 стародавних белорусских сортов льна, полиморфизм которых был исследован теми же методами. Из 143 аллелей 20 SSR-локусов, выявленных у стародавних белорусских сортов, 66 (46,2%) относились к редким (табл. 9.20).

Показатели полиморфизма SSR-локусов у сортов двух выборок оказались близки и достоверно не отличались ($p > 0,05$).

9.4.3.4. Выявление сортов льна с редкими и уникальными аллелями SSR-локусов

Оценивая полиморфизм SSR-локусов у изученных сортов, отдельно учитывали частоту встречаемости уникальных аллелей, которые присутствовали только у одного сорта данной выборки, и редких аллелей, частота встречаемости которых не превышала 5%.

В изучаемой выборке сортов льна масличного обнаружено 5 сортов с уникальными аллелями и 23 сорта с редкими аллелями (табл. 9.21). Суммарно из 78 аллелей, обнаруженных в выборке, 24 (30,1%) были редкими, в том числе 6 аллелей (7,7%) – уникальными. Сорта AL-340, Сонечны, Rio и Lirina имели и редкие, и уникальные аллели одновременно.

Максимальное число редких аллелей было зафиксировано у сорта AL-340 – 6 аллелей. 4 редких аллеля отмечено у сортов ACM Duff и Amon, по 3 редких аллеля имели сорта KF-1404, Moroccan, NDR-174, Lirina, Сонечны, ЦСОНАИ; по 2 – Deta, Michail, Rio; по 1 – Crown, K-180, La Plata, LM-98, Redwing Sel, Renew, Su – 6 – 15, Tezanopinto, Victory, Wironasel, Спартак.

В выборке из 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь, из 156 аллелей, выявленных

Таблица 9.21. Редкие аллели 12 SSR-локусов, характерные для изученных сортов льна масличного

Аллель		Сорт	Аллель		Сорт
Flu7	140	AL – 340, Victory, NDR-174	Flu10	143	Maroccan, KF-1404
Flu9	105	AL – 340, KF-1404		148	Renew, La Plata, NDR-174
Flu24	113	Rio, K-180, Maroccan		167	ACM Duff, ЦСОНАИ
	122	AL – 340		170	AL – 340, Amon, Wironasel
	144	Michail, Crown		173	ACM Duff, Amon, Deta
Flu25	173	ACM Duff, Maroccan, NDR-174		180	Lirina, Сонечны
	177	Сонечны	Flu21	143	ЦСОНАИ, KF-1404
	180	LM-98, Сонечны		160	Lirina, Michail
	183	Redwing Sel		167	ACM Duff, Tezanopinto
	200	Спартак, Su – 6 – 15, ЦСОНАИ		170	AL – 340, Amon
	225	AL – 340		173	Amon, Deta
	230	Rio		180	Lirina

Примечание. Полужирным шрифтом выделены сорта с уникальными аллелями.

Таблица 9.22. Редкие аллели SSR-локусов 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь

Аллель		Сорт	Аллель		Сорт
Lu2	206	Блакит, Ярок		279	Ласка, Веста
	216	Блакит, Форт, Ива, Могилевский		281	Дашковский
Lu4	156	Старт, Ритм	Lu17	283	Бренд
	168	Згода, Йитка		287	Merylin, Весна
	176	Merylin, Грот, Табор		291	Алей, Задор, Вита
	180	Алей, Задор		244	Веста, Грот
Lu13	366	Велич, Merylin, Табор	Lu23	254	Велич
	368	Бренд, Ручеек		262	Сюрприз
	382	Брестский, Ручеек	Flu8	166	Грот
	392	Задор		169	Велич
	396	Алей		172	Ива
Lu15a	100	Е-68	Flu7	190	Ласка
	115	Сюрприз		211	Алей
	118	Борец, Алей, Прамень		150	Ритм, Вита, Згода
	121	Задор		161	Задор
Lu15b	127	Алей	Flu9	115	Алей, Задор
	189	Борец, Ласка, Веста, Табор	Flu11	109	Алей, Блакит, Форт
	213	Задор		112	Борец, Задор
	216	Сюрприз, Алей, Задор	Flu25	179	Merylin
	226	Сюрприз		205	Ритм
160	Велич, Грот	208		Веста	
Lu3	172	Сюрприз, Задор	211	Старт, Левит 1, Нива, Belinka	
	195	Ярок	229	Алей, Вита	
Lu8	203	Нива, Йитка	Flu10	141	Старт, Нива, Ласка, Belinka
	205	Нива, Ритм, Прамень		144	Сюрприз

Аллель		Сорт	Аллель		Сорт
<i>Lu8</i>	221	Merylin	<i>Flu10</i>	153	Вита
	224	Сюрприз, Алей		159	Задор
	246	Старт	<i>Flu21a</i>	110	Алей
212	Вита, Ярок, Табор	112		Задор, Вита, Прамень	
<i>Lu21</i>	214	Блакит, Форт	<i>Flu21b</i>	140	Лето
	228	Сюрприз, Борец, Алей		153	Згода, Дашковский
	252	Старт, Belinka		159	Форт, Merylin
				164	Задор

Примечание. Полужирным шрифтом выделены сорта с уникальными аллелями.

в 20 SSR-локусах 65 (41,7%) были редкими, в том числе 30 аллелей (19,2%) были уникальными. В зависимости от локуса число редких аллелей варьировало от нуля (*Lu28*, *Flu24*) до шести (*Lu8*). В изученной выборке сортов льна обнаружен 31 сорт с редкими аллелями, в том числе 16 сортов с уникальными аллелями (табл. 9.22).

Частота встречаемости уникальных аллелей в выборке из 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь (19,2%), была достоверно выше, чем в выборке из 31 сорта льна масличного (7,7%).

Максимальное число редких аллелей было зафиксировано у сортов Алей и Задор – по 13 аллелей; 8 редких аллелей отмечено у сорта Сюрприз, по 6 редких аллелей имели сорта Вита и Merylin; 5 аллелей – сорт Старт, по 4 – Табор, Форт, Нива, Ласка, Грот, Веста, Велич, Борец, Блакит; по 3 – Згода, Прамень, Ритм, Ярок, Belinka; по 2 – Ручеек, Iitka, Ива, Бренд, Дашковский; по 1 – Брестский, Весна, Е-68, Левит 1, Лето, Могилевский. Сорта Задор, Алей, Сюрприз, Ярок, Merylin, Старт, Дашковский, Бренд, Велич, Грот, Ласка, Веста и Вита имели и редкие, и уникальные аллели одновременно.

Аналогичным образом учитывали частоту встречаемости уникальных и редких аллелей у 15 белорусских стародавних сортов.

Суммарно из 143 аллелей, выявленных в 20 SSR-локусах, 66 были редкими, в том числе 40 аллелей (28%) были уникальными. В зависимости от локуса, число редких аллелей варьировало от нуля (локусы *Flu21a*, *Flu24*) до тринадцати (*Flu25*) (табл. 9.23).

Частота встречаемости уникальных аллелей в выборке из 15 белорусских стародавних сортов льна (28%) была достоверно выше, чем в выборке из 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь (19,2%), и выборке из 31 сорта льна масличного (7,7%).

В изученной выборке у всех 15 сортов обнаружены как редкие, так и уникальные аллели. Максимальное число редких аллелей зафиксировано у сорта К-5990 – 11 редких аллелей, 10 редких аллелей имел сорт К-603, 8 – сорт К-790, по 7 – сорта К-6601, К-5455, К-5991, по 6 – К-5476, К-5460, К-5330, по 5 – К-37, К-5451, К-594, 4 аллеля – К-5992, 3 аллеля – К-6212, 2 аллеля – К-604.

Таблица 9.23. Редкие аллели SSR-локусов, характерные для изученных 15 белорусских стародавних сортов льна

Аллель		Сорт	Аллель		Сорт	
<i>Lu2</i>	200	K-790	<i>Flu8</i>	142	K-5330, K-5451	
	208	K-5460, K-5991		145	K-5455	
	212	K-5330		151	K-5460, K-5476	
	214	K-5460		157	K-5451	
	216	K-5991		160	K-594, K-5455	
<i>Lu4</i>	164	K-5330, K-5990		163	K-37, K-594	
	170	K-37		175	K-790	
	176	K-5992		178	K-5990	
	178	K-790, K-5476		183	K-5990	
<i>Lu13</i>	362	K-5455		187	K-5991, K-603	
	372	K-604	190	K-5991		
	376	K-603	<i>Flu7</i>	139	K-790, K-5990	
	380	K-5460		156	K-5476, K-5991	
	382	K-5451	<i>Flu9</i>	103	K-5330	
	384	K-603		115	K-5455, K-5476	
392	K-6601	<i>Flu11</i>	112	K-6212, K-603		
<i>Lu15a</i>	100	K-37, K-603	<i>Flu25</i>	158	K-5451, K-5476	
	115	K-6601, K-5990		170	K-5460	
<i>Lu15b</i>	216	K-790, K-5990		173	K-5451	
<i>Lu3</i>	160	K-5990		176	K-5455, K-5476	
	166	K-37, K-594		179	K-594	
<i>Lu8</i>	189	K-5330		188	K-37	
	211	K-6601, K-5992		196	K-790, K-5990	
	213	K-6212		199	K-5990	
	215	K-603		202	K-5991, K-604	
<i>Lu21</i>	218	K-5460		214	K-594, K-5330	
<i>Lu17</i>	281	K-603		217	K-6601	
	283	K-6212		220	K-790, K-6601	
	291	K-603		238	K-603	
<i>Lu23</i>	244	K-5990		<i>Flu10</i>	159	K-790, K-5455
	246	K-5992, K-603			162	K-6601, K-5992
	252	K-6601	165		K-5991	
<i>Lu28</i>	190	K-5990	<i>Flu21b</i>	153	K-5455	

Примечание. Полу жирным шрифтом выделены уникальные аллели.

Частота встречаемости уникальных аллелей в выборке из 15 белорусских стародавних сортов льна (28%) была достоверно выше, чем в выборке из 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь (19,2%), и выборке из 31 сорта льна масличного (7,7%).

9.4.3.5. Генетический полиморфизм сортов льна в зависимости от периода селекции

Для оценки уровня генетического разнообразия сортов в зависимости от периода их создания, были сформированы три группы, соответствующие различным периодам селекции льна:

№ 1 – стародавние белорусские сорта;

№ 2 – селекционные сорта льна, включенные в Госреестр Республики Беларусь до 2000 г.;

№ 3 – селекционные сорта льна, включенные в Госреестр Республики Беларусь после 2000 г.

Группы сортов разных периодов селекции различались по объему. Так, группа № 1 насчитывала 15 сортов, группа № 2 – 11 сортов и группа № 3 – 28 сортов (табл. 9.24).

Таблица 9.24. Показатели полиморфизма 20 микросателлитных локусов у трех групп сортов, созданных в разные периоды, рассчитанные по данным SSR-анализа

№ группы	Группа/число сортов	PIC (среднее)	Среднее значение, рассчитанное на сорт		
			число аллелей	число редких аллелей	число уникальных аллелей
1	Стародавние сорта, n = 15	0,764	9,5	4,4	2,7
2	Селекционные сорта, включенные в Госреестр до 2000 г., n = 11	0,645	8,5	3,2	1,5
3	Селекционные сорта, включенные в Госреестр после 2000 г., n = 28	0,755	5,4	2,3	0,7

Для каждой группы сортов были рассчитаны показатели полиморфизма 20 микросателлитных локусов (индекс PIC, среднее число аллелей на сорт, среднее число редких и уникальных аллелей на сорт), их значения указаны в табл. 9.24. Наиболее низкие значения PIC оказались у селекционных сортов группы № 2, однако значения показателей числа аллелей, числа редких и уникальных аллелей (рассчитанные в среднем на сорт) оказались ниже у современных сортов группы № 3.

Одной из возможных причин выявленных различий между группами сортов может быть разный объем выборки. Для нивелирования влияния различий в численности сортов в разных группах на величину показателей полиморфизма был использован метод бутстреп-размножения выборок [43]. Для этого в каждой из трех групп было создано по 10 подвыборок (каждая численностью в 11 сортов) методом случайного повторного отбора [44].

Для каждой группы № 1, № 2 и № 3, состоящей из 10 таких подвыборок, были рассчитаны показатели полиморфизма 20 микросателлитных локусов. Эти результаты приведены в табл. 9.25 и, для большей демонстративности, на рис. 9.28. Достоверность различий показателей полиморфизма у разных групп сортов рассчитывали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Таблица 9.25. Различия в показателях полиморфизма в трех группах сортов
различных периодов селекции, вычисленные
с использованием метода бутстреп-размножения выборок**

№ подвыборки, (каждая включает по 11 сортов)	PIC	Число аллелей	Среднее число аллелей на сорт	Число редких аллелей	Среднее число редких аллелей на сорт	Число уникальных аллелей	Среднее число уникальных аллелей на сорт
<i>Группа № 1, стародавние белорусские сорта</i>							
1	0,716	102,0	9,3	28,0	2,5	19,0	1,7
2	0,724	117,0	10,6	56,0	5,1	26,0	2,4
3	0,733	123,0	11,2	62,0	5,6	33,0	3,0
4	0,756	122,0	11,1	52,0	4,7	29,0	2,6
5	0,749	129,0	11,7	65,0	5,9	40,0	3,6
6	0,703	108,0	9,8	50,0	4,5	21,0	1,9
7	0,735	121,0	11,0	55,0	5,0	28,0	2,5
8	0,723	120,0	10,9	57,0	5,2	40,0	3,6
9	0,746	127,0	11,5	64,0	5,8	30,0	2,7
10	0,730	107,0	9,7	39,0	3,5	23,0	2,1
Среднее значение	0,732*	117,6	10,7*	52,8	4,8*	28,9	2,6*
<i>Группа № 2, селекционные сорта льна, включенные в Госреестр Республики Беларусь до 2000 г.</i>							
1	0,629	88	8,0	27,0	2,5	17,0	1,5
2	0,662	89	8,1	34,0	3,1	4,0	0,4
3	0,632	89	8,1	35,0	3,2	15,0	1,4
4	0,620	89	8,1	40,0	3,6	15,0	1,4
5	0,661	90	8,2	33,0	3,0	7,0	0,6
6	0,640	87	7,9	26,0	2,4	14,0	1,3
7	0,597	85	7,7	32,0	2,9	17,0	1,5
8	0,653	88	8,0	29,0	2,6	6,0	0,5
9	0,583	77	7,0	23,0	2,1	6,0	0,5
10	0,640	91	8,3	32,0	2,9	16,0	1,5
Среднее значение	0,632	87,3	7,9	31,1	2,8	11,7	1,1
<i>Группа № 3, селекционные сорта льна, включенные в Госреестр Республики Беларусь после 2000 г.</i>							
1	0,691	11	1,0	54,0	4,9	26,0	2,4
2	0,688	104	9,5	55,0	5,0	26,0	2,4
3	0,741	121	11,0	56,0	5,1	30,0	2,7
4	0,707	113	10,3	54,0	4,9	28,0	2,5
5	0,700	109	9,9	45,0	4,1	22,0	2,0
6	0,724	123	11,2	67,0	6,1	34,0	3,1
7	0,734	120	10,9	59,0	5,4	28,0	2,5
8	0,744	122	11,1	59,0	5,4	32,0	2,9
9	0,744	120	10,9	56,0	5,1	28,0	2,5
10	0,750	124	11,3	27,0	2,5	23,0	2,1
Среднее значение	0,722*	106,7	9,7*	53,2	4,8*	27,7	2,5*

* Значения данных показателей полиморфизма достоверно выше в группах № 1 и № 3 по сравнению с группой № 2.

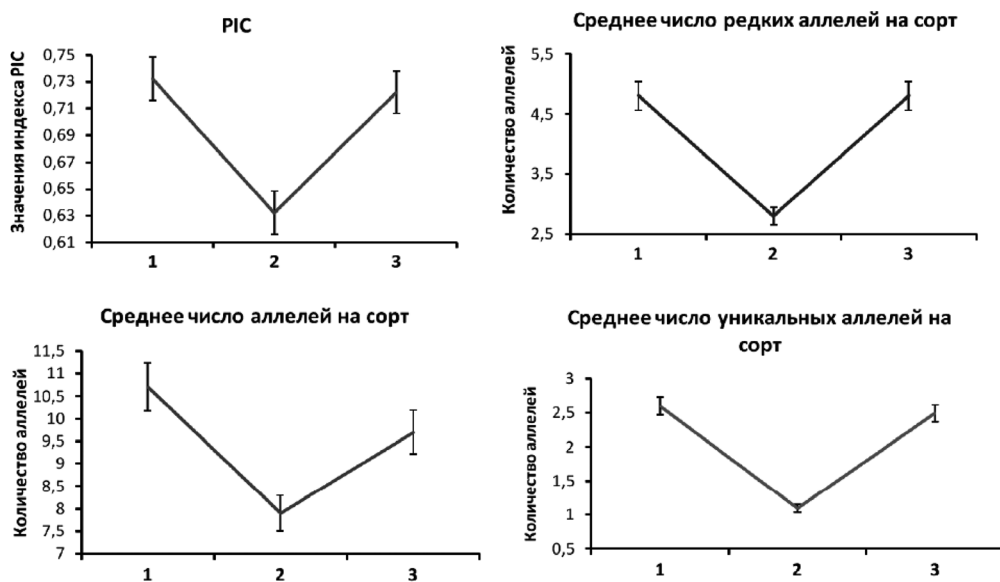


Рис. 9.28. Значения показателей полиморфизма у сортов различных периодов селекции, рассчитанные по результатам анализа полиморфизма 20 микросателлитных локусов: 1 – белорусские стародавние сорта; 2 – селекционные сорта льна, включенные в Госреестр Республики Беларусь до 2000 г.; 3 – селекционные сорта льна, включенные в Госреестр Республики Беларусь после 2000 г.

При использовании метода бутстреп-размножения выборок для подсчета показателей полиморфизма у разных групп сортов группа № 2 имели достоверно более низкие значения показателя PIC, числа аллелей, числа редких и уникальных аллелей (рассчитанные в среднем на сорт) по сравнению как со стародавними (группа № 1), так и с современными сортами (группа № 3). Современные (группа № 3) и стародавние сорта (группа № 1) по показателям PIC, числу аллелей, числу редких и уникальных аллелей на сорт достоверно не различались. Более низкие значения показателей уровня полиморфизма у селекционных сортов льна, включенных в Госреестр до 2000 г., могут объясняться как методами селекции, так и использованием в этот период селекции ограниченного числа сортов-доноров, применяемых для гибридизации и создания исходного материала для селекционного процесса при выведении новых сортов.

В первой половине XX в. наиболее распространенным методом селекции был аналитический, так называемый массовый отбор, при котором семена лучших растений объединяли и высевали вместе [45], что объясняет большое генетическое разнообразие стародавних сортов (группа № 1). В послевоенный период льноводство в Беларуси возрождалось в основном за счет районирования российских сортов льна, которые впоследствии включались в селекцию. Так, в 1956 г. в Беларуси был районирован высокопродуктивный сорт Смоленской ГОСХОС Л-1120 [45], который использовался в дальнейшем при создании многих сортов в качестве донора генов устойчивости к фузариозному увяданию и ржавчине [46], что привело к генетической однородности возделываемых сортов льна-долгунца

(группа № 2). Это подтверждается и данными RAPD-анализа стародавних и современных сортов льна [6].

В последние годы в Республике Беларусь проводится интенсивная селекционная работа по созданию большого количества новых высокопродуктивных сортов льна (группа № 3) с привлечением современных методов селекции и включением в селекционный процесс зарубежных сортов. Вследствие этого происходит восстановление и расширение генетического разнообразия современных сортов. Полученные нами данные о высокой степени гетерогенности белорусских стародавних сортов позволяют рекомендовать их в качестве компонентов скрещивания для увеличения генетического разнообразия существующего генофонда льна.

9.4.3.6. Оценка уровня гетерозиготности сортов льна с использованием микросателлитных маркеров

Использование SSR-маркеров позволяет определить степень гетерозиготности генотипов. Рассчитанные значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности изученных 20 SSR-локусов 39 сортов льна, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь приведены в табл. 9.26.

Таблица 9.26. Значения ожидаемого и наблюдаемого уровней гетерозиготности в изученных 20 SSR-локусах у 39 сортов льна

Локус	Число аллелей	<i>He</i>	<i>Ho</i>
<i>Lu2</i>	6	0,753	0,667
<i>Lu4</i>	9	0,786	0,615
<i>Lu13</i>	12	0,869	0,513
<i>Lu15a</i>	8	0,690	0,128
<i>Lu15b</i>	9	0,789	0,949
<i>Lu3</i>	7	0,807	0,359
<i>Lu8</i>	10	0,801	0,359
<i>Lu21</i>	8	0,754	0,385
<i>Lu17</i>	9	0,777	0,205
<i>Lu23</i>	10	0,862	0,615
<i>Lu28</i>	6	0,789	0,308
<i>Flu8</i>	9	0,752	0,231
<i>Flu7</i>	7	0,808	0,462
<i>Flu9</i>	5	0,708	0,538
<i>Flu11</i>	4	0,523	0,462
<i>Flu24</i>	3	0,539	0,513
<i>Flu25</i>	11	0,832	0,538
<i>Flu10</i>	9	0,711	0,795
<i>Flu21a</i>	5	0,575	0,487
<i>Flu21b</i>	9	0,756	0,410
Среднее на локус	7,8 ± 0,531	0,744 ± 0,022	0,477 ± 0,044

П р и м е ч а н и е. *He* – ожидаемая гетерозиготность; *Ho* – наблюдаемая гетерозиготность.

Значения уровней наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности находились в пределах 0,128–0,949 (в среднем 0,477) и 0,523–0,869 (в среднем 0,744) соответственно (табл. 9.26). Такие высокие значения гетерозиготности свойственны микросателлитным локусам из-за множественности аллельных вариантов, обусловленных изменчивостью числа повторяющихся мотивов ДНК [47].

Корреляций между наблюдаемым и ожидаемым уровнем гетерозиготности в отношении локусов микросателлитов не обнаружено.

Основываясь на оценке числа аллелей каждого из 20 изученных SSR-локусов, были выявлены сорта, имеющие наибольшее число локусов в гетерозиготном состоянии. 18 локусов в гетерозиготном состоянии имел сорт льна-долгунца Алей, по 15 локусов – сорта Лето, Борец, Ритм, Заказ, 14 локусов – сорт Задор. Все эти сорта современной селекции и были созданы в 2003–2010 гг. 17 гетерозиготных локусов имел сорт Вита, включенный в Госреестр в 1999 г. В выборке стародавних белорусских сортов 17 гетерозиготных локусов имел сорт К-6601, 15 локусов – К-5990, 14 локусов – К-5991.

Показано, что высокогетерозиготные организмы имеют большую адаптивную способность [48]. Для исследования возможной связи 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 (допущенные к использованию в одном-двух регионах).

Для этих двух групп сортов были подсчитаны ожидаемая (H_e) и наблюдаемая (H_o) гетерозиготность. На гистограмме, представленной на рис. 9.29, приведены средние значения наблюдаемого и ожидаемого уровня гетерозиготности для двух групп сортов.

Рассчитанные показатели ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности 20 SSR-локусов были несколько выше (значения статистически не достоверны) в группе широкоадаптивных сортов по сравнению с узкоадаптивными сортами (рис. 9.29). Однако для более объективной оценки взаимосвязи степени гетерозиготности и адаптивности сортов необходимо анализировать данные для гораздо большего числа SSR-локусов.

Для оценки уровня генетического разнообразия сортов льна-долгунца в зависимости от длины вегетационного периода были сформированы три группы сортов: 1) раннеспелые; 2) среднеспелые; 3) позднеспелые.

Группы сортов незначительно различались по объему. Так, группа № 1 насчитывала 11 сортов, группа № 2 – 12 сортов и группа № 3 – 13 сортов. Для каждой группы сортов были рассчитаны показатели полиморфизма 20 микросателлитных локусов:

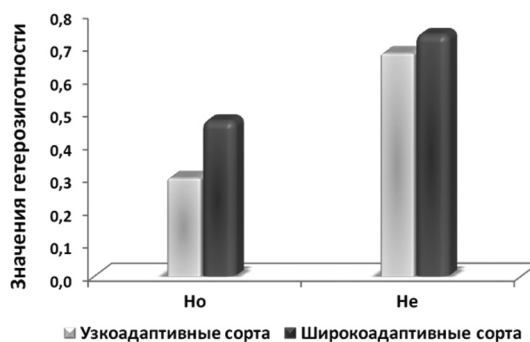


Рис. 9.29. Ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность по 20 изученным локусам у широкоадаптивных и узкоадаптивных сортов льна

Таблица 9.27. Показатели полиморфизма 20 микросателлитных локусов у трех групп сортов льна-долгунца с разной длиной вегетационного периода, рассчитанные по данным SSR-анализа

№ группы	Группа/число сортов	PIC (<i>He</i>)	<i>Ho</i>	Среднее значение, рассчитанное на сорт		
				число аллелей	число редких аллелей	число уникальных аллелей
1	Раннеспелые, n = 11	0,707	0,541	10,2	4,6	2,5
2	Среднеспелые, n = 12	0,736	0,508	10,0	3,9	1,8
3	Позднеспелые, n = 13	0,678	0,396	7,7	2,4	1,0

индекс PIC, который совпадает с ожидаемой гетерозиготностью; наблюдаемая гетерозиготность; среднее число аллелей на сорт; среднее число редких и уникальных аллелей на сорт (табл. 9.27).

Достоверно наиболее низкие значения всех показателей оказались у позднеспелых сортов группы № 3, что говорит о большей выравненности этих сортов (табл. 9.27).

Необходимо учитывать, что реальная частота генотипов, имеющих SSR-локусы в гомозиготном состоянии, может быть ниже в случае наличия в определенных локусах «нулевых» аллелей [49].

9.4.3.7. Изучение генетических взаимосвязей сортов льна на основе SSR-анализа

Для построения дендрограммы, демонстрирующей филогенетические отношения между изученными сортами льна по результатам SSR-анализа, применили метод невзвешенного попарного арифметического среднего (UPGMA) [50], метод связывания ближайших соседей (NJ) [51], при котором в кластер объединяются последовательности, дающие наименьшую сумму всех ветвей дендрограммы, а также метод Варда [52, 53], который отличается от других тем, что использует методы дисперсионного анализа для оценки расстояний между кластерами. Метод Варда минимизирует сумму квадратов (SS) для любых двух (гипотетических) кластеров, которые могут быть сформированы на каждом шаге. В целом метод весьма эффективен, хотя стремится создавать кластеры малого размера [54].

Особенностью кластерного анализа является иерархический алгоритм, который изначально предполагает существование некой структуры между изучаемыми объектами, хотя они могут быть совершенно не связаны между собой [55]. В связи с этим в дополнение к кластерному анализу мы использовали один из методов факторного анализа – метод главных компонент (principal component analysis, PCA). Этот метод не предполагает существования иерархии между объектами и проводится на основе корреляционной матрицы между переменными [56]. Показано эффективное использование факторного анализа для изучения изменчивости биологических объектов, а также для уточнения и подтверждения результатов кластерного анализа [57–60].

Для построения дендрограмм мы использовали пакет программ PHYLIP 3.96 [61] и DArwin5 [62]. С помощью бутстреп-метода [63] оценивали значимость филогенетических реконструкций с использованием 100 репликаций. Выборка сортов льна включала 3 сорта льна масличного, 36 сортов льна-долгунца, а также 15 стародавних белорусских сортов льна.

Индексы генетического сходства и генетические дистанции рассчитывались по М. Nei [25]. Максимальными значениями коэффициента сходства характеризовались сорта льна-долгунца Е-68 и К-65 (0,716), Ласка и Веста (0,712), Блакит и Форт (0,710), что указывает на значительное генетическое сходство данных сортов. Нулевое значение коэффициента сходства было отмечено у пар сортов Задор – к-594, и Задор – к-5330. Также низкие значения коэффициента сходства были отмечены для пар сортов Пралеска – к-5451 (0,031), Задор – Ласка (0,034), Старт – к-5990 (0,035), Велич – к-604 (0,048) и Задор – Веста (0,051), что говорит о наибольшей удаленности данных сортов и возможности их использования в селекции для расширения генетического разнообразия сортов льна.

По результатам кластерного анализа, выполненного по данным оценки полиморфизма 20 SSR-локусов у 54 сортов льна, специфического группирования сортов по происхождению из разных селекционных центров и отношению к разным периодам селекции не выявлено, за исключением части белорусских стародавних сортов, группирующихся вместе. Высокие значения бутстрепа поддерживали только пары сортов или небольшие группы – до трех сортов, которые, по данным анализа родословных, созданы на основе общего генетического материала.

На рис. 9.30–9.33 представлены дендрограммы генетического подобия 54 сортов льна, построенные методами UPGMA, NJ, Варда, а также результаты применения РСА-метода.

По результатам как кластерного (рис. 9.30–9.32), так и факторного (рис. 9.33) анализа можно выделить лишь небольшие группы сортов, объединяющихся вместе, независимо от метода кластеризации.

Например, в отдельный подкластер (группа № 6 на рис. 9.30–9.32) независимо от метода кластеризации с высокими значениями бутстреп-поддержки объединились сорта льна масличного Брестский, Ручеек и Лирина различного происхождения. Данные сорта выделились в отдельную группу также и по результатам РСА-анализа (рис. 9.33). В одну группу (группа № 7 на рис. 9.30–9.33) объединились 7 сортов льна из разных селекционных центров. Сорта К-65 и Е-68 селекции Института льна НАН Беларуси с 69%-ной бутстреп-поддержкой группируются с сортом Весна селекции Могилевской сельскохозяйственной опытной станции НАН Беларуси, что может быть обусловлено наличием в родословной сорта К-65 сорта Могилевский (селекции Могилевской сельскохозяйственной опытной станции НАН Беларуси).

Сорт Пралеска селекции Института льна НАН Беларуси с 55%-ной бутстреп-поддержкой группируется с сортом голландской селекции Лаура. В родословной сорта Пралеска один из предков представлен формой с зашифрованным названием (F3546), и, возможно, в его создании принимал участие сорт Лаура.

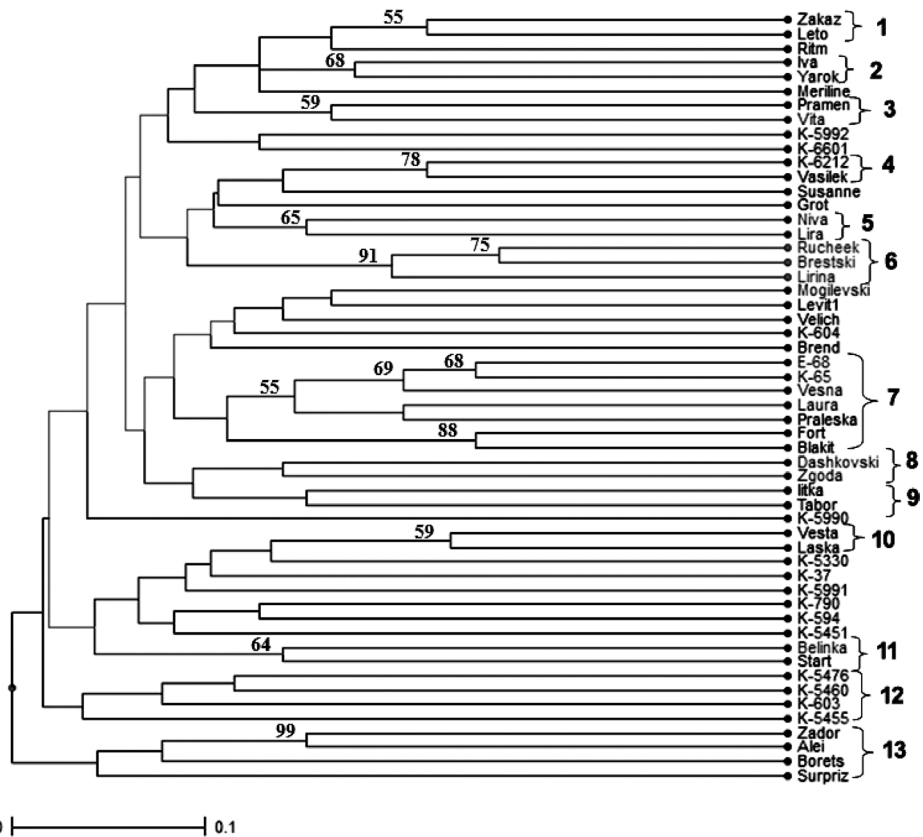


Рис. 9.30. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений сортов льна масличного, белорусских ландрас, сортов, включенных в Госреестр до 2000 г., сортов, включенных в Госреестр после 2000 г., построенная с использованием метода UPGMA: 1–13 – группы сортов, кластеризующихся вместе с использованием методов UPGMA, NJ и метода Варда. Цифрами внутри ветвей обозначены значения бутструп-поддержки

Следует отметить, что сорта Василек и Пралеска, созданные методом многократного индивидуального отбора из одной гибридной популяции Ника \times $\{(F3546 \times \text{Оршанский } 2) \times [(\text{Оршанский } 2 \times \text{K-512}) \times \text{K-486}]\}$ с использованием мутагенеза, попали в разные кластеры, что, вероятно, объясняется возникновением мутаций в разных локусах.

Также в этой группе с 88%-ной бутструп-поддержкой оказалась пара среднеспелых сортов селекции Института льна НАН Беларуси – Блакит и Форт. Все семь сортов данной группы, несмотря на разное происхождение, находятся рядом также и по результатам РСА-анализа, что позволяет предположить их генетическую близость.

Белорусские ландрасы долгунцового типа K-5476, K-5460, K-5455 группируются вместе с ландрасой масличного типа K-603 (группа № 12 на рис. 9.30–9.32). Однако по результатам РСА-анализа ландраса K-603 оказалась генетически ближе к ландрасе масличного типа K-604.

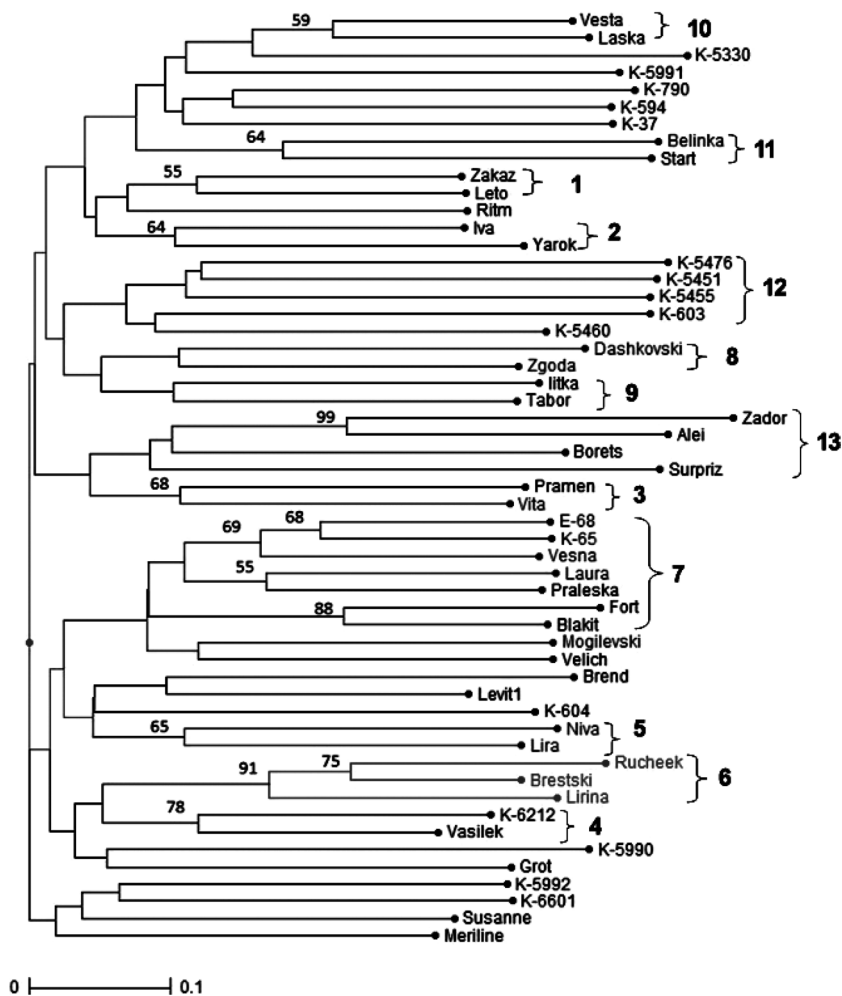


Рис. 9.31. Дендрогамма филогенетических взаимоотношений сортов льна масличного, белорусских ландрас, сортов, включенных в Госреестр до 2000 г., сортов, включенных в Госреестр после 2000 г., построенная с использованием метода NJ: 1–13 – группы сортов, кластеризующихся вместе с использованием методов UPGMA, NJ и метода Варда. Цифрами внутри ветвей обозначены значения бутстреп-поддержки

Отдельную группу сформировали четыре сорта селекции Могилевской сельскохозяйственной опытной станции НАН Беларуси Алей, Задор, Сюрприз и Борец (группа № 13 на рис. 9.30–9.32). Сорта Алей и Задор, имеющие в родословных общего предка (сорт Призыв), объединились в одном субкластере с 99%-ной бутстреп-поддержкой. К ним примыкают сорта Борец, в родословной которого также присутствует сорт Призыв, и Сюрприз, одним из родителей которого был сорт Згода, который, как и сорт Алей, имеет в родословной генетический материал сорта Дашковский.

Также выявлено 9 пар сортов (группы № 1–5, № 8–11 на рис. 9.30–9.32), которые объединялись вместе с высокой бутстреп-поддержкой, независимо

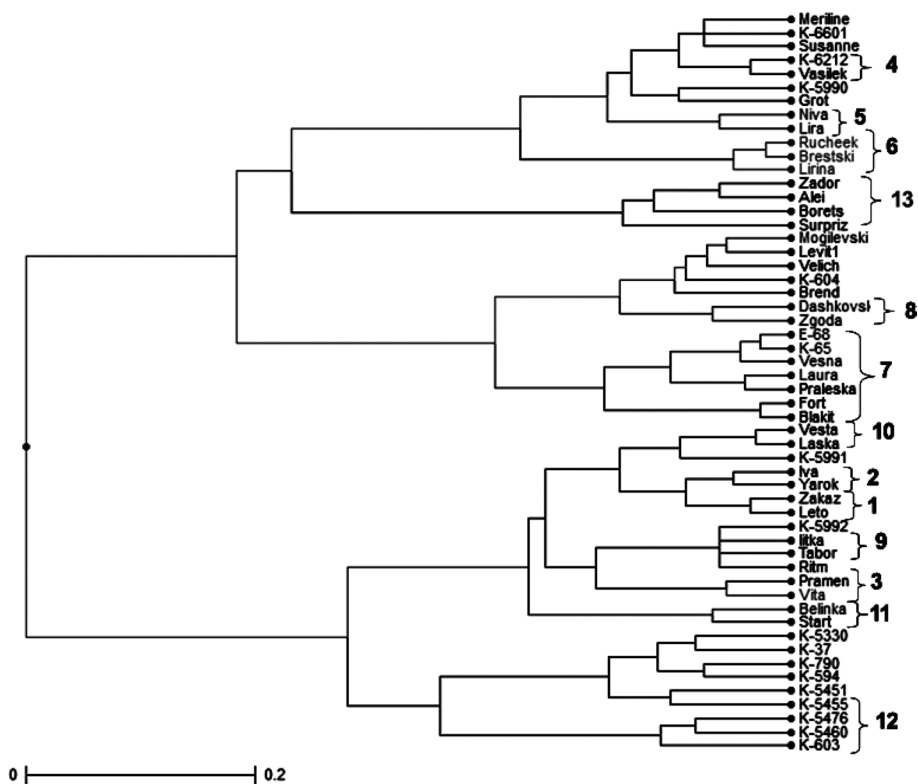


Рис. 9.32. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений сортов льна масличного, белорусских ландрас, сортов, включенных в Госреестр до 2000 г., сортов, включенных в Госреестр после 2000 г., построенная с использованием метода Варда: 1–13 – группы сортов, кластеризующихся вместе с использованием методов UPGMA, NJ и метода Варда

от метода кластеризации. Сводная характеристика групп сортов приведена в табл. 9.28.

В первой группе объединились сорта льна-долгунца Заказ и Лето селекции Могилевской сельскохозяйственной опытной станции НАН Беларуси, имеющие в своих родословных общих предков. Сорт Лето получен методом сложной ступенчатой гибридизации с участием сортов 128812, Спартак, М-9, Призыв 81, Прогресс, ВНИИЛ-3, Бирюза, Луч, Вперед, Шокинский, К-6. Сорт Заказ получен методом гибридизации и многократным индивидуальным отбором с использованием сортов Сигнал и Лира. А в родословной сорта Лира, в свою очередь, принимали участие сорта Спартак, Прогресс и К-6.

Во второй группе объединились сорта Ива и Ярлок селекции Института льна НАН Беларуси, включенные в Госреестр в 2008 г. В доступной литературе данных о родословной сортов не обнаружено, однако они схожи по морфологическим признакам (коэффициент сходства 0,99) и, вероятно, созданы на основе общего генетического материала или близких родительских форм.

В третью группу попали сорта Вита и Прамень. Оба сорта созданы в Институте льна НАН Беларуси в 1999 и 2001 г. соответственно. В создании сорта Вита

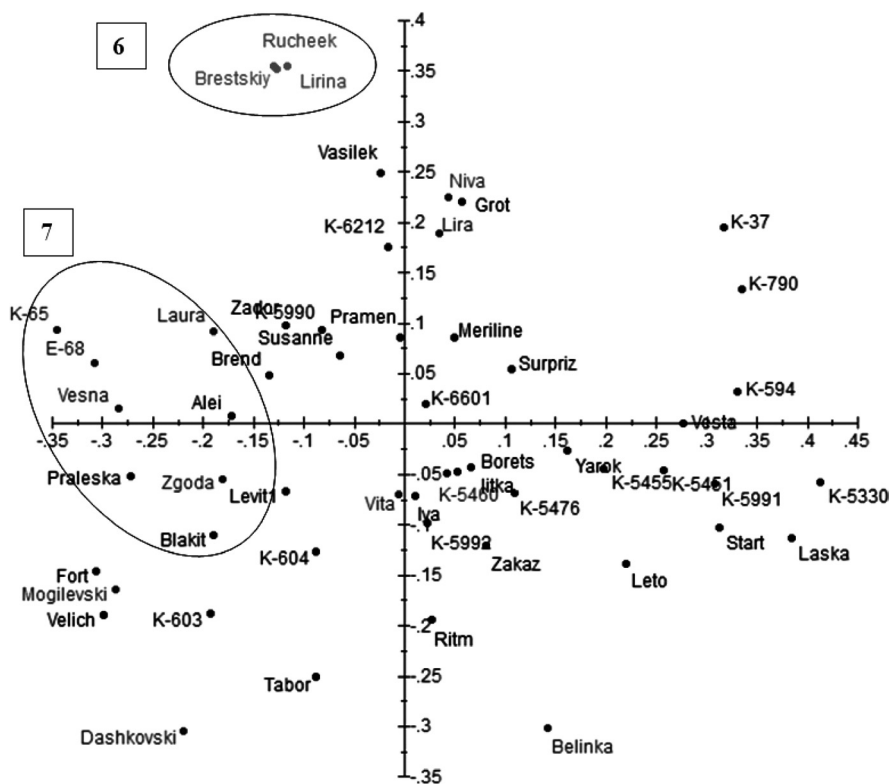


Рис. 9.33. Результаты PCA-метода льна масличного, белорусских ландрас, сортов, включенных в Госреестр до 2000 г., сортов, включенных в Госреестр после 2000 г., с использованием метода NJ: 6, 7 – группы сортов, кластеризующихся вместе с использованием методов UPGMA, NJ и метода Варда

принимал участие сорт Оршанский 2, а в создании сорта Прамень – сорт Вперед. И Оршанский 2 и Вперед созданы на основе сорта Л-1120, что подтверждает их общее происхождение.

Сорт Василек и белорусская ландраса долгунцового типа К-6212 объединились в одном подкластере с 78%-ной бутстреп-поддержкой. Известно, что сорт Василек получен методом многократного индивидуального отбора из гибридной популяции Ника × {(F3546 × Оршанский 2) × [(Оршанский 2 × К-512) × К-486]} с использованием лучей лазера и химических мутагенов, и хотя в его родословной присутствует ландраса К-486 неизвестного происхождения, метод селекции не позволяет судить об общности селекционного материала.

В один подкластер с 65%-ной бутстреп-поддержкой объединились среднеспелые сорта Нива и Лира селекции Могилевской сельскохозяйственной опытной станции НАН Беларуси, имеющие в своих родословных сорта Спартак и Прогресс.

В отдельный подкластер объединились среднеспелые сорта селекции Могилевской сельскохозяйственной опытной станции НАН Беларуси Згода и Дашковский. Их группировка объясняется тем, что сорт Дашковский является одним из родителей сорта Згода.

Таблица 9.28. Характеристика групп сортов, кластеризующихся вместе с использованием методов UPGMA, NJ и метода Варда

Группа	Сорт	Год	Происхождение [40]	Оригинатор	Вегетация
1	Заказ	2007	Сигнал × Лира	МОСХОС НАН Беларуси	Среднеспелый
	Лето	2003	128812, Спартак, М-9, Призыв 81, Прогресс, ВНИИЛ-3, Бирюза, Луч, Вперед, Шокинский, К-6	МОСХОС НАН Беларуси	Раннеспелый
2	Ива	2008	–	Институт льна НАН Беларуси	Среднеспелый
	Ярок	2008	–	Институт льна НАН Беларуси	Раннеспелый
3	Вита	1999	Ника × (Оршанский 2 × К-512) × К-4861	Институт льна НАН Беларуси	Раннеспелый
	Прамень	2001	(Айяги × Вперед) × Устьянский	Институт льна НАН Беларуси	Позднеспелый
4	Василек	2002	Ника × {(F3546 × Оршанский 2) × [(Оршанский 2 × К-512) × К-486]}	Институт льна НАН Беларуси	Позднеспелый
	К-6212	1958	–	Местный сорт	Среднеспелый
5	Нива	1993	Тверца, Спартак, Полет, линия № 168 (Прогресс)	МОСХОС НАН Беларуси	Среднеспелый
	Лири	1998	Спартак, Томский 9, ВНИИЛ-3, Вперед, Прогресс, Оршанский 2, К-6, Могилевский, Родник и Дашковский	МОСХОС НАН Беларуси	Среднеспелый
6	Брестский	2012	–	Институт льна НАН Беларуси	Масличный
	Лирина	2001	–	Германия	Масличный
7	Ручеек	2000	–	ВНИИМК, Россия	Масличный
	Весна	1999	Смоленский × 56-Д-К-43	МОСХОС НАН Беларуси	Раннеспелый
	К-65	1996	Фибра, Т-10, Могилевский, П-359, Аоуагі	Институт льна НАН Беларуси	Позднеспелый
	Е-68	1996	Российский, К-6	Институт льна НАН Беларуси	Среднеспелый

	Лаура	1998	–	Нидерланды	Позднеспелый
7	Пралеска	2002	Ника × {(F3546 × Оршанский 2) × [(Оршанский 2 × К-512) × К-486]}	Институт льна НАН Беларуси	Раннеспелый
	Блакит	2004	(Оршанский 2 × К-512) × К-486	Институт льна НАН Беларуси	Среднеспелый
	Форт	2006	Белинка × Призыв	Институт льна НАН Беларуси	Среднеспелый
	Згода	1998	F ₁ (Могилевский × Торжокский-4) × F ₁ (Дашковский × Нива)	МОСХОС НАН Беларуси	Среднеспелый
8	Дашковский	1990	Прогресс, Вперед, Бирюза, линия 99 (Оршанский 2)	МОСХОС НАН Беларуси	Среднеспелый
	Табор	2008	–	Sempra Praha A. S., Чехия	Позднеспелый
9	Йитка	2010	–	Agrires, Чехия	Позднеспелый
	Ласка	2011	–	Институт льна НАН Беларуси	Раннеспелый
10	Веста	2011	–	Институт льна НАН Беларуси	Раннеспелый
	Белинка	1986	–	Нидерланды	Позднеспелый
11	Старт	2003	(Дашковский – семья № 17) × ♂ (Могилевский 2 × Белинка)	МОСХОС НАН Беларуси	Раннеспелый
	К-5476	1939	–	Местный сорт	Среднеспелый
	К-5460	1939	–	Местный сорт	Среднеспелый
	К-603	1923	–	Местный сорт	Среднеспелый, масличный тип
12	К-5455	1939	–	Местный сорт	Среднеспелый
	Алей	2007	203-ЧЗ-7-3 (Могилевский, Дашковский, Белинка, Згода) и 1-Х4-3-4 (Призыв, Прогресс, Тайга)	МОСХОС НАН Беларуси	Среднеспелый
13	Задор	2010	37-Ф2-3-2 (А-29, Призыв) × Лето	МОСХОС НАН Беларуси	Раннеспелый
	Сюрприз	2004	♀3года × ♂Сигнал	МОСХОС НАН Беларуси	Среднеспелый
	Борец	2005	8-М4-3-10[Призыв × 9 2-1-1 (Луч × Прогресс)] × Дашковский 2	МОСХОС НАН Беларуси	Среднеспелый

В данной группе объединились позднеспелые сорта чешской селекции Табор и Йитка.

В одной группе объединились сорта Ласка и Веста селекции Института льна НАН Беларуси, включенные в Госреестр в 2011 г. В доступной литературе данных о родословной сортов не обнаружено.

В данном подкластере группируются сорт Белинка голландской селекции и сорт Старт селекции Могилевской сельскохозяйственной опытной станции НАН Беларуси, одним из родителей которого является сорт Белинка.

Литература

1. Oh, T. J. RFLP and RAPD mapping in flax (*Linum usitatissimum*) / T. J. Oh // Theor. Appl. Genetics. – 2000. – Vol. 101. – P. 590–593.
2. Aldrich, J. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using KlenTaqI DNA polymerase, Chelex 100 and gel purification of genomic DNA / J. Aldrich // Plant Mol. Biol. Rep. – Vol. 11. – P. 128–141.
3. Cullis, C. A. RAPD polymorphisms in flax genotrophs / C. A. Cullis // Plant Mol. Biol. – 1999. – Vol. 41. – P. 795–800.
4. Fu, Y. B. RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L. / Y. B. Fu // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2002. – Vol. 49. – P. 253–259.
5. Применение RAPD-анализа для определения таксономического статуса диких сородичей культурного льна / В. А. Лемеш [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2001. – Т. 45, № 3. – P. 88–90.
6. Лемеш, В. А. RAPD анализ межвидовой генетической изменчивости и филогенетических связей видов льна (*Linum* L.) / В. А. Лемеш, М. В. Богданова, Л. В. Хотылева // Доклады НАН Беларуси. – 2006. – Т. 50, № 2. – С. 51–54.
7. Diederichsen, A. Flax genetic diversity as the raw material for future success / A. Diederichsen, Y. B. Fu // International Conference on Flax and Other Bast Plants, Agriculture and Agri-Food Canada. – Saskatchewan, 2008. – P. 270–280.
8. Fu, Y. B. Geographic patterns of RAPD variation in cultivated flax / Y. B. Fu // Crop Sci. – 2005. – Vol. 45. – P. 1084–1091.
9. Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the sad2 locus / R. G. Allaby [et al.] // Theor. Appl. Genetics. – 2005. – Vol. 112. – P. 58–65.
10. RAPD Analysis of 54 north american flax cultivars / Y. B. Fu [at al.] // Crop Sci. – 2003. – Vol. 43. – P. 1510–1515.
11. Fu, Y. B. Genetic diversity within a range of cultivars and landraces of flax (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by RAPDs / Y. B. Fu // Gen. Res. and Crop EV. – 2002. – Vol. 49. – P. 167–174.
12. Fu, Y. B. Phenotypic and molecular (RAPD) differentiation of four infraspecific groups of cultivated flax / Y. B. Fu // Gen. Res. and Crop EV. – 2006. – Vol. 53. – P. 77–90.
13. Гузенко, Е. В. Молекулярно-генетический анализ сортов льна масличного (*Linum usitatissimum* L.) методом RAPD / Е. В. Гузенко, В. А. Лемеш, Л. В. Хотылева // Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2008. – № 2. – С. 41–45.
14. Лемеш, В. А. Молекулярные маркеры в изучении генетических ресурсов / В. А. Лемеш // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2008. – Т. 8. – С. 94–104.
15. Fu, Y. B. Assessment of bulking strategies for RAPD analysis of flax germplasm / Y. B. Fu // Gen. Res. and Crop EV. – 2003. – Vol. 50. – P. 743–746.
16. Лемеш, В. А. Молекулярный анализ гетерогенности белорусских сортов и лендрас льна / В. А. Лемеш // Докл. НАН Беларуси. – 2007. – Т. 51, № 6. – С. 78–81.
17. Fu, Y. B. Genetic diversity within a range of cultivars and landraces of flax (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by RAPDs / Y. B. Fu // Gen. Res. and Crop EV. – 2002. – Vol. 49. – P. 167–174.
18. Reddy, M. P. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding / M. P. Reddy // Euphytica. – 2002. – Vol. 128. – P. 9–17.

19. I. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and its wild progenitor pale flax (*Linum bienne* Mill.) as revealed by ISSR markers / H. Uysal // Gen. Res. and Crop EV. – 2010. – Vol. 57. – P. 1109–1119.
20. Wiesner, I. Insertion of a reamplification round into the ISSR–PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns / I. Wiesner // Cell. Mol. Boil. Letters. – 2003. – Vol. 8. – P. 743–748.
21. Wiesnerova, D. ISSR-based clustering of cultivated flax germplasm is statistically correlated to thousand seed mass / D. Wiesnerova // Mol. Biotech. – 2004. – Vol. 26. – P. 207–214.
22. Rajwade, A. V. Relatedness of indian flax genotypes (*Linum usitatissimum* L.): an inter-simple Sequence Repeat (ISSR) primer assay / A. V. Rajwade // Mol. Biotech. – 2010. – Vol. 45, № 2. – P. 161–170.
23. Uysal, H. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and its wild progenitor pale flax (*Linum bienne* Mill.) as revealed by ISSR markers / H. Uysal // Gen. Res. and Crop EV. – 2010. – Vol. 57. – P. 1109–1119.
24. Chen, Y. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers / Y. Chen // Plant Cell Rep. – 1998. – Vol. 18. – P. 44–48.
25. Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations / M. Nei // Proc. Nat. Acad. Sci USA. – 1973. – Vol. 70, № 12. – P. 3321–3323; Changes in genetic diversity during seven cycles of recurrent selection for grain yield in oat, *Avena sativa* L. / D. L. De Koeber [et al.] // Plant Breeding. – 1999. – Vol. 118, № 1. – P. 37–43.
26. Duvick, D. N. Genetic diversity in major farm crops on the farm and in reserve / D. N. Duvick // Economic Botany. – 1984. – Vol. 38, № 2. – P. 161–178.
27. Tanksley, S. D. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild / S. D. Tanksley, S. R. McCouch // Science. – 1997. – Vol. 277, № 5329. – P. 1063–1066.
28. Tripp, R. Biodiversity and modern crop varieties: sharpening the debate / R. Tripp // Agriculture and Human Values. – 1996. – Vol. 13, № 4. – P. 48–63.
29. Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity / J. Villard [et al.] // Crop Sci. – 1998. – Vol. 38, № 5. – P. 1339–1347.
30. RAPD-анализ разнопродуктивных сортов и гибридов льна культурного (*Linum usitatissimum* L.) / В. Н. Стегний [и др.] // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 10. – С. 1370–1373.
31. Генетическая изменчивость современных сортов и стародавних белорусских образцов льна-долгунца по данным RAPD-анализа / В. А. Лемеш [и др.] // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова; редкол.: М. В. Роїка [и др.]. – Київ, 2006. – Т. 3. – С. 118–122.
32. RAPD-анализ современных сортов и стародавних белорусских образцов льна-долгунца / В. А. Лемеш [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск, 2006. – Т. 2. – С. 64–70.
33. Genetic variability of modern cultivars and ancient Belarusian accessions of fiber flax in terms of RAPD-analysis data / V. Lemesh [et al.] // 12th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology [Electronic resource]. – CD Proceedings. – Magdeburg, 2006. – 1 CD-ROM.
34. Fu, Y. B. Effectiveness of bulking procedures in measuring population-pairwise similarity with dominant and co-dominant genetic markers / Y. B. Fu // Theor. Appl. Genetics. – 2000. – Vol. 100, № 8. – P. 1284–1289.
35. Jaccard, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale / P. Jaccard // Bull. Soc. Vaudoise Sci. Natur. – 1908. – Vol. 44. – P. 223–270.
36. Генетический полиморфизм рода *Linum* по данным RAPD-анализа / В. А. Лемеш [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2005. – Т. 1. – С. 176.
37. Vromans, J. Molecular genetic studies in flax (*Linum usitatissimum* L.): PhD thesis / J. Vromans; Wageningen University. – The Netherlands, 2006. – 143 p.
38. Polymorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum* / C. Roose-Amsaleg [et al.] // Mol. Ecol. Notes. – 2006. – Vol. 6, № 3. – P. 796–799.
39. Генетическое разнообразие сортов льна томской селекции / Г. А. Мичкина [и др.] // Вестник ВОГиС. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 698–700.
40. Лен-долгунец // Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений [Электронный ресурс]. – 2013. – Режим доступа: <http://sorttest.by/d/306784/d/len-dolgunes.pdf>. – Дата доступа: 17.09.2013.

41. Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the sad2 locus / R. G. Allaby [et al.] // Theor. Appl. Genetics. – 2005. – Vol. 112. – P. 58–65.
42. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from flax (*Linum usitatissimum* L.) / X. Deng [et al.] // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10, № 5. – P. 734–739.
43. Швачко, Н. А. Генетическое разнообразие селекционных сортов картофеля коллекции ВИР, выявленное SSR анализом: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07 / Н. А. Швачко; Всерос. НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова. – СПб., 2012. – 22 с.
44. Дубров, А. М. Многомерные статистические методы / А. М. Дубров, В. С. Мхитарян, Л. И. Трошин. – М., 2003. – 350 с.
45. Лен Беларуси / под ред. И. В. Голуба. – Минск, 2003. – 245 с.
46. Рожмина, Т. А. Генетическое разнообразие льна (*Linum usitatissimum* L.) и его комплексное использование в селекции: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 06.01.05, 03.00.15 / Т. А. Рожмина; Всерос. НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова РАСХН. – Торжок, 2004. – 42 с.
47. Алтухов, Ю. Г. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю. Л. Алтухов, Е. А. Салменкова // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 9. – С. 1173–1195.
48. Алтухов, Ю. Г. Генетические процессы в популяциях / Ю. Г. Алтухов. – М., 2003. – 432 с.
49. Incidence and origin of «null» alleles in the (AC)_n microsatellite markers / D. F. Callen [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1993. – Vol. 52, № 5. – P. 922–927.
50. Sneath, P. H. A. Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification / P. H. A. Sneath, R. R. Sokal. – San Francisco, 1973. – 573 p.
51. Лукашов, В. В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / В. В. Лукашов. – М., 2009. – 256 с.
52. Perrier, X. Data analysis methods / X. Perrier, A. Flori, F. Bonnot // Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants / P. Hamon [et al.]; ed. by P. Hamon. – Montpellier, 2003. – P. 43–76.
53. Ward, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function / J. H. Ward // Journal of the American Statistical Association. – 1963. – Vol. 58, № 301. – P. 236–244.
54. StatSoft, Inc. Электронный учебник по статистике // StatSoft, Inc. [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: <http://www.statsoft.ru/home/textbook/default.htm>. – Дата доступа: 8.10.2013.
55. О применении кластерного анализа в биогеографических классификациях / А. И. Кафанов [и др.] // Журнал общей биологии. – 2004. – Т. 65, № 3. – С. 250–265.
56. Rozalia, G. M. Q-Factor Analysis (Q-Methodology) as data analysis technique / G. M. Rozalia // Annals of the University of Oradea, Economic Science Series. – 2008. – Vol. 17, № 4. – P. 871–876.
57. Акинина, Г. Е. Изучение изменчивости микросателлитных локусов сортов нута из разных стран методами молекулярного дисперсионного (AMOVA) и Q-факторного анализов / Г. Е. Акинина // Вестн. Харьков. нац. ун-та им. В. Н. Каразина. – 2011. – Т. 13, № 947. – С. 63–68.
58. Изменчивость ядерных микросателлитных маркеров у лиственниц Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) и камчатской (*Larix kamschatica* (Rupr.) Carr) / Н. В. Орешкова [и др.] // Хвойные бореальной зоны. – 2012. – Т. 30, № 12. – С. 145–151.
59. Ким, Дж.-О. Факторный, дискриминантный и кластерный анализ / Дж.-О. Ким, У. Мьюллер, У. Р. Клекка. – М., 1989. – 215 с.
60. Wiesemuller, B. Q-Factor Analysis as a tool for phylogenetic studies of morphometric data / B. Wiesemuller, H. Rothe // Anthrop. Anz. – 2006. – Vol. 64, № 3. – P. 345–353.
61. PHYLIP [Electronic resource] / ed. by J. Felsenstein. – 2010. – Mode of access: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>. – Date of access: 21.05.2012.
62. Perrier, X. DARwin software [Electronic resource] / ed. by X. Perrier, J. P. Jacquemoud-Collet. – 2006. – Mode of access: <http://darwin.cirad.fr/darwin>. – Date of access: 12.05.2012.
63. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редакторов	5
Принятые сокращения	6
<i>ЧАСТЬ 1. ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ</i>	
Глава 1. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур на основе ДНК-маркеров (Урбанович О. Ю., Кузмицкая П. В., Картель Н. А.)	10
1.1. Преимущества молекулярных методов идентификации генотипов	11
1.2. Основные типы молекулярных маркеров, используемых для идентификации генотипов	12
1.3. Принцип метода ДНК-идентификации с помощью SSR-маркеров	14
1.4. Методика ДНК-фингерпринтинга с помощью SSR-маркеров	17
1.5. Применение методов ДНК-фингерпринтинга	23
Литература	25
Глава 2. Молекулярные технологии в селекции пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.)	29
2.1. Генетическое разнообразие сортов пшеницы, выращиваемых в Беларуси (Фомина Е. А., Мальшев С. В., Урбанович О. Ю., Куликович С. Н., Картель Н. А.)	29
2.1.1. Анализ информативности микросателлитных маркеров	31
2.1.2. Анализ генетического разнообразия сортов, культивируемых на территории Республики Беларусь	33
Литература	38
2.2. Маркер-сопутствующая селекция пшеницы по признаку устойчивости к бурой ржавчине (Булойчик А. А., Долматович Т. В.)	40
2.2.1. Возможность сочетания молекулярных и фитопатологических методов исследования	41
2.2.2. Маркирование эффективных генов устойчивости	43
2.2.3. Анализ сортов мягкой яровой пшеницы, внесенных в Государственный реестр Республики Беларусь, на наличие генов устойчивости к возбудителю бурой ржавчины	47
Литература	54
Глава 3. Молекулярные технологии в селекции ячменя (<i>Hordeum vulgare</i> L.) (Луханина Н. В., Давыденко О. Г.)	56
Литература	69
Глава 4. Определение типичности инбредных линий и идентификация простых гибридов кукурузы (<i>Zea mays</i> L.) на основе полиморфизма микросателлитной ДНК (Лемеш В. А., Сидоренко Е. В., Гузенко Е. В., Хотылева Л. В.)	72
4.1. Биохимический анализ запасного белка кукурузы (зеина)	76

4.2. Молекулярно-генетический анализ чистоты и типичности изучаемых линий кукурузы с помощью SSR-ПЦР	78
4.3. Идентификация простых гибридов кукурузы с помощью микросателлитных маркеров	85
Литература	91
Глава 5. Молекулярно-генетические исследования цитоплазматической мужской стерильности у ржи (<i>Secale cereale</i> L.) в связи с селекцией на гетерозис (Шимко В. Е., Гордей И. А., Аксенова Е. А., Ярмолинский Д. В.)	93
Литература	97
Глава 6. Молекулярно-цитогенетический анализ линий гексаплоидных тритикале (\times <i>Triticosecale</i> Wittm.) с интрогрессиями от дикорастущих видов эгилопсов (Орловская О. А., Адомина И. Г., Салина Е. А., Хотылева Л. В.)	99
6.1. Реорганизация геномного состава линий гексаплоидных тритикале при интрогрессии генетического материала от дикорастущих видов эгилопсов	105
6.2. Влияние генотипа на формирование хозяйственно ценных признаков у линий гексаплоидных тритикале	108
Литература	112
Глава 7. Молекулярные технологии в селекции сои (<i>Glycine max</i> L.) (Аксенова Е. А., Давыденко О. Г.)	116
7.1. Сиквенс и анализ генома сои	117
7.2. Генетические карты и молекулярные маркеры	119
7.3. Молекулярное маркирование генов, отвечающих за состав и качество зерна	123
7.3.1. SSR-анализ гибридных популяций F ₂ для маркер-сопутствующей селекции белорусских сортов сои	127
7.4. Молекулярные маркеры и устойчивость сои к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды	128
7.5. Молекулярное маркирование генов фотопериодизма у сои	130
7.5.1. Дифференциация коллекционных сортообразцов сои по молекулярным маркерам для определения источника аллеля E7	133
7.6. Базы данных	135
7.7. ДНК-маркеры как средство оценки генетического разнообразия и идентификации сортообразцов	137
Литература	140
Глава 8. Идентификация геном-специфических ДНК-маркеров для оценки генетического полиморфизма рапса (<i>Brassica napus</i> L.) в целях создания сортов пищевого назначения (Лемеш В. А., Пилюк Я. Э., Грушецкая З. Е., Мозгова Г. В., Бакановская А. В., Пикун О. А., Хотылева Л. В.)	146
8.1. Особенности организации генома <i>Brassica napus</i> L.	148
8.2. Идентификация генов <i>FAEI</i> , контролирующих синтез эруковой кислоты в масле семян рапса	149
8.3. Маркер-сопутствующий отбор по генам, контролирующим уровень содержания олеиновой и линоленовой ненасыщенных жирных кислот в рапсовом масле	154
8.4. Анализ сортов рапса по локусам, контролирующим уровень содержания клетчатки в семенах	161
Литература	164
Глава 9. Молекулярные технологии в селекции льна (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	167
9.1. Идентификация и паспортизация сортов льна на основе ДНК-маркеров (Лемеш В. А., Богданова М. В., Кильчевский А. В., Хотылева Л. В.)	167
Литература	175

9.2. Молекулярно-генетический анализ <i>fad3</i> генов льна масличного (Лемеш В. А., Богданова М. В.)	176
Литература	183
9.3. Молекулярно-генетическая идентификация генов семейства целлюлозосинтаз, контролирующих формирование лубяного волокна льна (<i>Linum usitatissimum</i> L.) (Галиновский Д. В., Анисимова Н. В., Райский А. П., Леонтьев В. Н., Туток В. В., Кильчевский А. В., Хотылева Л. В.)	184
9.3.1. Ферменты биосинтеза целлюлозы	186
9.3.2. Особенности структуры генов целлюлозосинтаз растений	188
9.3.3. Биосинтез целлюлозы в клетках льна	191
9.3.4. Идентификация генов целлюлозосинтаз, функционирующих в стеблях, листьях и апикальной части растений льна-долгунца	193
9.3.5. Сравнительный анализ генов целлюлозосинтаз льна культурного (<i>Linum usitatissimum</i> L.) с их ортологами <i>Arabidopsis thaliana</i>	197
9.3.6. Разработка метода RFLP-анализа для идентификации генов целлюлозосинтаз льна культурного (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	200
Литература	204
9.4. Молекулярно-генетический анализ полиморфизма подвидов льна культурного для идентификации генотипов с редкими ДНК-локусами (Лемеш В. А., Богданова М. В., Кубрак С. В., Никитинская Т. В., Туток В. В., Хотылева Л. В.)	206
9.4.1. Оценка генетического разнообразия сортов льна с помощью RAPD и ISSR анализа	206
9.4.2. Сравнительная оценка генетического разнообразия современных сортов и белорусских ландрас льна с помощью RAPD-анализа	212
9.4.3. Оценка генетического разнообразия сортов льна с помощью SSR-анализа	216
9.4.3.1. Оценка полиморфизма SSR-локусов сортов льна различной селекционной направленности и географического происхождения	217
9.4.3.2. Оценка полиморфизма SSR-локусов сортов льна масличного	220
9.4.3.3. Оценка полиморфизма SSR-локусов сортов льна-долгунца, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь, и стародавних белорусских сортов	221
9.4.3.4. Выявление сортов льна с редкими и уникальными аллелями SSR-локусов	223
9.4.3.5. Генетический полиморфизм сортов льна в зависимости от периода селекции	227
9.4.3.6. Оценка уровня гетерозиготности сортов льна с использованием микросателлитных маркеров	230
9.4.3.7. Изучение генетических взаимосвязей сортов льна на основе SSR-анализа	232
Литература	240
Глава 10. Использование ДНК-маркеров в селекции картофеля (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	243
10.1. Селекция картофеля с помощью ДНК-маркеров (Ермишин А. П., Воронкова Е. В., Лукаш В. И.)	243
10.1.1. Типы ДНК-маркеров, используемые в селекции картофеля	245
10.1.2. ДНК-маркеры для детекции доминантных генов устойчивости к болезням и вредителям картофеля	246
10.1.2.1. ДНК-маркеры для детекции генов устойчивости к фитофторозу картофеля	246
10.1.2.2. ДНК-маркеры для детекции генов устойчивости к золотистой цистообразующей нематодe	247
10.1.2.3. ДНК-маркеры для детекции генов устойчивости к Y-вирусу картофеля (PVY)	249
10.1.2.4. ДНК-маркеры для детекции генов устойчивости к X-вирусу картофеля (PVX)	249
10.1.2.5. ДНК-маркеры для детекции генов устойчивости к вирусу скручивания листьев картофеля (ВСКЛ, PLRV, L-вирусу)	250
10.1.2.6. ДНК-маркеры для детекции генов устойчивости к раку картофеля	251

10.2. Особенности картофеля как объекта MAS. Направления использования MAS в селекции картофеля (Ермишин А. П., Воронкова Е. В., Лукиш В. И.)	251
10.2.1. Применение ДНК-маркеров для оценки исходного селекционного материала.	252
10.2.1.1. Оценка исходного материала для селекции картофеля с целью выделения носителей ДНК-маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям.	254
10.2.1.2. Оценка аллельного состояния селекционно ценных генов в исходном материале	260
10.2.2. Использование MAS в селекции картофеля с применением отбора на диплоидном уровне	264
10.2.2.1. Оценка дигаплоидов картофеля из коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси на наличие ПЦР-маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям	265
10.2.2.2. Получение и оценка первичных дигаплоидов сортов картофеля, отобранных по комплексу ДНК-маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям	268
Литература	272
10.3. Молекулярные маркеры в селекции на низкое содержание моносахаридов в клубнях картофеля (Кондратюк А. В., Козлов В. А., Кильчевский А. В.)	276
10.4. Молекулярные маркеры в экспертизе на отличимость, однородность и стабильность (Кондратюк А. В., Козлов В. А., Кильчевский А. В.)	284
Литература	288
Глава 11. Молекулярные технологии в селекции томата (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) (Кильчевский А. В., Бабак О. Г., Некрашевич Н. А., Аджиева В. Ф., Малышев С. В., Грушецкая З. Ф., Мишин Л. А., Добродькин М. М., Зайцева И. Е., Пугачева И. Г.)	290
11.1. Использование SSR-маркеров для ДНК-идентификации паспортизации сортов и гибридов томата.	291
11.2. Генетическая детерминация процессов созревания у томата.	294
11.2.1. Разработка маркеров и типирование коллекции по генам лежкости	296
11.3. Генетическая детерминация процессов накопления каротиноидов у томата	301
11.3.1. Разработка маркеров и типирование коллекции по генам измененного содержания каротиноидов	303
11.4. Создание форм, сочетающих гены повышенного содержания каротиноидов и длительного периода сохранности плодов, на основе методов ДНК-типирования	310
11.5. Отбор форм томата методами ДНК-типирования с двумя генами качества в популяциях F_2	315
11.6. Создание гибридов F_1 с тремя генами качества плодов и перспективы их использования	319
11.7. Генетическая детерминация устойчивости к болезням.	322
11.7.1. Использование методов ДНК-типирования в селекции на устойчивость к болезням у томата	324
11.7.2. Разработка технологии маркер-сопутствующего отбора томата по признаку устойчивости к кладоспориозу и ДНК-типирование коллекции	324
11.7.3. Разработка технологии маркер-сопутствующего отбора томата по признаку устойчивости к фузариозу и ДНК-типирование коллекции	326
11.7.4. Разработка технологии маркер-сопутствующего отбора томата по признаку устойчивости к мелойдогинозу и ДНК-типирование коллекции	327
11.7.5. Изучение возможности одновременного выявления аллелей устойчивости к кладоспориозу и нематоду у томата с использованием маркера 2-5CF/2-5CR.	329
11.7.6. Разработка методических основ идентификации гена устойчивости к фитофторе Ph-3 и ДНК-типирование образцов изучаемой коллекции	330
11.8. Создание и изучение гибридов F_1 с комплексной устойчивостью к болезням	331
11.9. ДНК-скрининг поколения гибридов F_2 для отбора гомозиготных форм с генами устойчивости к болезням	333
11.10. Сочетание методов MAS и гаметной селекции для создания сортов и гибридов томата с одновременной устойчивостью к пониженным температурам и болезням	334
Литература	338

Глава 12. ДНК-маркирование исходного материала овощных культур для селекции гетерозисных гибридов (Шантуренко М. Н., Тарутина Л. А., Мишин Л. А., Якимович А. В., Забара Ю. М., Кильчевский А. В., Хотылева Л. В.)	345
12.1. Перец сладкий (<i>Capsicum annuum</i> L.)	349
12.2. Капуста белокочанная (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC.)	358
Литература	362
Глава 13. Геномные биотехнологии в селекции сахарной свеклы (<i>Beta vulgaris</i> L.) (Свирицкая А. М., Мальшева О. М., Милько Л. В., Кильчевский А. В.)	367
13.1. RFLP-маркеры	368
13.2. RAPD-маркеры	369
13.2.1. RAPD-фингерпринтинг близкородственных генотипов свеклы.	371
13.2.2. RAPD-фингерпринтинг для идентификации линий и гибридов свеклы	376
13.3. AFLP-маркеры	381
13.3.1. AFLP-фингерпринтинг линий сахарной свеклы гиногенетического происхождения и в группах «донорное материнское растение – гиногенетическое потомство».	384
13.3.2. AFLP-фингерпринтинг у культивируемых <i>in vitro</i> побегов гиногенетических линий сахарной свеклы разного возраста	385
13.4. SSR-маркеры	386
Литература	390
Глава 14. Молекулярные маркеры в селекции яблони (<i>Malus × domestica</i> Borkh.)	393
14.1. Генетическое разнообразие сортов яблони и методы их ДНК-идентификации (Урбанович О. Ю., Кузмицкая П. В., Козловская З. А., <u>Картель Н. А.</u>)	393
14.1.1. Особенности генома яблони	394
14.1.2. SSR-маркеры для идентификации генотипов яблони	394
14.1.3. Анализ генетического разнообразия сортов яблони	395
14.1.4. Генетическое сходство генотипов яблони.	401
14.1.5. ДНК-паспортизация сортов яблони	403
Литература	406
14.2. Молекулярные маркеры в селекции яблони на устойчивость к болезням (Урбанович О. Ю., Козловская З. А., Кузмицкая П. В., Васеха В. В., <u>Картель Н. А.</u>)	407
14.2.1. Молекулярные маркеры в селекции яблони на устойчивость к парше	409
14.2.1.1. Отбор и анализ устойчивости к парше гибридных семян яблони с геном <i>Rvi6(Vf)</i>	410
14.2.1.2. Отбор и анализ устойчивости к парше гибридных семян яблони с геном <i>Rvi17(Val)</i>	414
14.2.2. Создание семян яблони с комплексной устойчивостью к парше.	417
14.2.3. Молекулярные маркеры в селекции яблони на устойчивость к мучнистой росе	419
Литература	427
Глава 15. Генетическое разнообразие сортов груши и методы их ДНК-идентификации (род <i>Pyrus</i>) (Урбанович О. Ю., Кузмицкая П. В., Козловская З. А., Якимович О. А., <u>Картель Н. А.</u>)	430
15.1. Особенности генома груши	430
15.1.1. SSR-маркеры для идентификации генома груши.	430
15.2. Генетическое разнообразие сортов груши, выращиваемых в Беларуси	431
15.3. Генетическое сходство сортов груши	436
15.4. ДНК-идентификация и паспортизация сортов груши	438
Литература	439
Глава 16. Молекулярная характеристика патогенных вирусов плодовых и ягодных культур (Волосевич Н. Н., Колбанова Е. В., Соловей О. В., Кухарчик Н. В.)	441
16.1. Вирус кустистой карликовости малины	443
16.2. Вирус реверсии смородины черной	450

16.3. Вирус мозаики яблони	453
16.4. Вирус косточковых культур – вирус Шарки сливы	457
16.4.1. Молекулярное типирование штаммовой принадлежности белорусских изолятов вируса Шарки	458
16.4.2. Определение нуклеотидных последовательностей ПЦР-фрагментов	459
Литература	463
Глава 17. Молекулярно-генетические аспекты изучения лесных древесных видов растений (Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Каган Д. И., Ковалевич О. А., Пантелеев С. В., Ивановская С. И.)	467
17.1. Популяционная генетика и таксономия	468
17.1.1. Популяционное разнообразие	468
17.1.2. Экотипическое разнообразие	471
17.1.3. Геногеография	474
17.1.4. Таксономия	478
17.2. Селекция и семеноводство	483
17.2.1. Анализ генов, детерминирующих хозяйственно ценные признаки	483
17.2.2. Маркер-сопутствующая селекция	485
17.2.3. Мутагенез и полиплоидия	486
17.2.4. Семеноводство	488
17.3. Молекулярная фитопатология	492
17.4. Генетическая экспертиза	500
Литература	503
Глава 18. Молекулярные маркеры в таксономии, метаболом-направленной селекции и сохранении генетических ресурсов Центрального ботанического сада НАН Беларуси (Стиридович Е. В., Власова А. Б., Юхимук А. Н., Гончарова Л. В., Агабалаева Е. Д., Решетников В. Н.)	507
18.1. Род <i>Vaccinium</i> L.	510
18.2. Род <i>Amaranthus</i> L.	515
18.3. Род <i>Potentilla</i> L.	520
18.4. Род <i>Trigonella</i> L.	522
18.5. Род <i>Syringa</i> L.	527
Литература	533

ЧАСТЬ 2. ТРАНСГЕНЕЗ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Глава 1. Методы создания трансгенных растений (Картель Н. А.)	538
1.1. Агробактериальная трансформация	540
1.2. Прямая трансформация и микробомбардировка	542
1.3. Промоторы	543
1.4. Экспрессия трансгенов	545
1.5. Хозяйственно ценные трансгенные растения	547
1.6. Практическое использование трансгенных растений	555
1.7. Вопросы безопасности и перспективы	558
Литература	559
Глава 2. Создание трансгенных растений табака (род <i>Nicotiana</i>) и арабидопсиса (<i>A. thaliana</i>) с генами биосинтеза рамнолипидов (Картель Н. А., Бричкова Г. Г., Манешина Т. В.)	562
2.1. Создание векторных конструкций	564
2.2. Создание трансгенных растений	566
2.3. Молекулярно-генетический анализ трансформантов	570
2.4. Биохимический анализ трансформантов	572

2.5. Толерантность трансгенных растений к тяжелым металлам	575
2.6. Толерантность к нефти и нефтепродуктам	580
Литература	586
Глава 3. Трансгенез в селекции картофеля (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	588
3.1. Трансгенные растения картофеля с геном эндохитиназы ([<i>Кармель Н. А.</i>], <i>Шахба- зов А. В., Панюш А. С.</i>)	588
3.1.1. Создание и молекулярно-генетический анализ трансформантов	589
3.1.2. Биохимический анализ трансгенных растений	593
3.1.3. Анализ противопатогенного эффекта трансгена хитиназы	596
Литература	
3.2. Трансгенные растения картофеля с геном <i>cry3aM</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> ([<i>Кармель Н. А.</i>], <i>Исаенко Е. В., Межнина О. А.</i>)	605
3.2.1. Создание систем экспрессии гена <i>cry3aM</i> в растениях	606
3.2.2. Получение и молекулярно-генетический анализ трансгенных растений картофеля	609
3.2.3. Анализ инсектицидных свойств гена <i>cry3aM</i>	612
Литература	615
Глава 4. Генетическая трансформация льна-долгунца (<i>Linum usitatissimum</i> L.) (<i>Лемеш В. А., Гузенко Е. В.</i>)	616
4.1. Агробактериальная трансформация льна-долгунца генетической конструкцией с хи- мерным геном <i>gfp-tuaб</i>	619
4.2. Агробактериальная трансформация льна-долгунца генетической конструкцией с ге- ном <i>aroA</i> , придающим устойчивость к гербициду глифосату	623
4.3. Биобаллистическая трансформация льна-долгунца конструкцией с химерным геном <i>gfp-tuaб</i>	625
4.4. Анализ линий, сформированных на основе растений – «ложных трансформантов»	629
Литература	643