

Литература

1. Кандыбин Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика – М.: Агропромиздат, 1989. – 172 с.
2. Лескова А.Я., Рыбина Л.М., Строева И.А. Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств. (Методические указания). – Л.: изд. Всесоюз. НИИ защиты растений, 1984. – 21 с.
3. Определитель бактерий Бержи в 2-х т. / [Под ред. Дж.Хоулта, Н. Крига и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т.1. – 432 с.
4. Определитель бактерий Бержи в 2-х т. / [Под ред. Дж.Хоулта, Н. Крига и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т.2. – 368 с.
5. Epplen J.T., Ammer H., Epplen C. Oligonucleotide Fingerprinting using Simple repeat Motifs: A convenient, Ubiquitously Applicable Method to Detect Hypervariability for Multiple Purposes // eds Burke G., Dolf G., Jeffreys A.J., Wolff G. Basel: Birkhauser. – 1991. – P. 50–69.
6. Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C., de Bruijn F.J. // Appl. environ. Microbiol. – 1994. – Т. 60. – С. 2286–2295.
7. Zotov V.S., Punina N.V., Khapchaeva S.A., Didovich S.V., Melnichuk T.N., Topunov A.F. New taxonomic marker – *hin*-region // Ekologicheskaya genetika. – 2012. – Т. 2. – С. 49–62.
8. Пунина Н.В., Зотов В.С., Пархоменко А.Л., Пархоменко Т.Ю., Топунов А.Ф. Изучение генетического разнообразия *Bacillus thuringiensis*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи анализа генов *16S* рПНК, *gyrB* и методов АР-ПЦР и saAFLP // Acta Naturae. – 2013. – Т. 5, №1. – С. 93-103.

PARKHOMENKO A.L.¹, PUNINA N.V.^{2,3}, ZOTOV V.S.², PARKHOMENKO T. YU.¹

¹*Institute of agricultural of Crimea of NAAS*

Ukraine, 95453, AR Crimea, Simferopol, Kievskaya, 150, e-mail: tat.parkhomenko@rambler.ru

²*A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS*

Russia, 11907, Moscow, Leninsky prospect, 33, build. 2

³*Research Center for Medical Genetics RAMS*

Russia, 115478, Moscow, Moskvorechje, 1

PHYSIOLOGY -BIOCHEMICAL AND GENETICALLY CHARACTERISTICS OF PERSPECTIVE INSECT PATHOGEN STRAINS *BACILLUS THURINGIENSIS*

Aims. The estimate of efficiency of new natural strains of *B. thuringiensis*, definite its physiology-biochemical characteristics and identification of new strains. **Methods.** In our work we using the collection, typical and new strains of *B. thuringiensis*. We using microbiological and molecular-biological methods (Rep-PCR: ERIC-PCR, BOX-PCR and new methods – saAFLP. **Results.** The strains of *Bt* 0376p.o. and 0408 have the high insecticide activity to larvae of colorado beetle. The death of larvae on 10 day of carrying out of experiments was 100%. In accordance with physiology-biochemical reactions the strain of *Bt* 0376p.o. was grouped to I serotype, the strain of *Bt* 0408 – to X serotype. But by saAFLP and other methods (Rep-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR the both one were grouped with the type strains *Bt* subsp. *thuringiensis* B-1223. **Conclusions.** It was estimate of strains efficiency of *B. thuringiensis* 0376p.o. and 0408 against to larvae of potato beetle – 100 %. It was shown that the both investigated strains belong to I serotype by saAFLP method.

Key words: *B. thuringiensis*, efficiency, single adaptor AFLP.

РОНИН Е.И., МИНКОВА Д.М., МЕСТЕР Д.И., КОРОЛЬ А.Б.

University of Haifa, Institute of Evolution

Mount Carmel, Haifa 31905 Israel, e-mail: efim@research.haifa.ac.il

МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ SNP-МАРКЕРОВ

Новые технические возможности, позволяющие тысячи маркеров на хромосому, требуют модернизации программных средств построения генетических карт, способных переработать не больше сотен маркеров в хромосоме.

Желание иметь гигантское число маркеров при относительно низком объеме популяции (затраты проекта пропорциональны количеству особей в популяции) оправдывается стремлением «залатать дыры в генетической карте». Тут же возни-

кают проблемы «утилизации» огромного числа абсолютно сцепленных маркеров, разошедшихся из-за ошибок их идентификации. Удивительным является тот факт, что абсолютно сцепленные маркеры расходятся и выстраиваются в генетической карте, порождая «облака» ошибочно упорядоченных маркеров, сильно увеличивающих длину карты. Когда маркеров не так много, 100-200 на хромосому, с этим удаётся справиться в рамках традиционных подходов (Mester, et al 2003, Ronin et al 2010). Но при тысячах маркеров

Материалы и методы.

1. Метод окрестностей (МО). Предлагается подход решения проблемы, заключающийся в ослаблении требования, которое позволяло исключать абсолютно сцепленные маркеры. А именно, вместе с абсолютно сцепленными маркерами исключаются маркеры, принадлежащие некоторой окрестности опорных маркеров, радиус которой мы заранее определяем (Рис. 1). Выбор опорных маркеров может быть случайным из оставшегося множества маркеров после удаления окрестности предыдущего опорного маркера, а может быть направленным – выби-

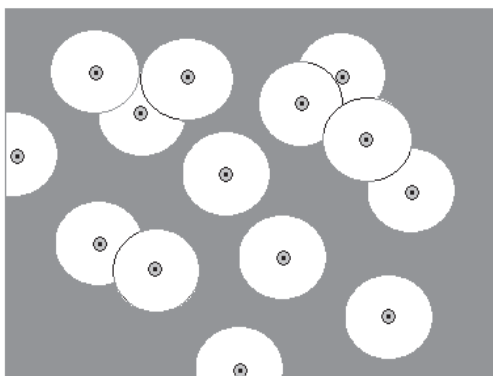


Рис.1

Тогда вероятность того, что у всех особей оба аллеля маркера m будут безошибочно идентифицированы, равна:

$$P=(1-p)^N=(1-0.01)^{100}\approx e^{-1}. \quad (1)$$

Это значит, что примерно третья часть абсолютно сцепленных с m маркеров останутся абсолютно сцепленными и безошибочными. Насколько идея метода работает, легко увидеть, проделав следующие простые оценки. Пусть хромосома имеет длину 100 сМ., тогда, имея популяцию типа *backcross* объемом 100 особей, мы можем рассчитывать на определение мини-

на хромосому, которые поставляет нам SNP-технология, трудности решения задачи становятся непреодолимыми. В работе предлагаются два метода, которые направлены на преодоление этой трудности.

Важным моментом является понимание того, что наличие определённого уровня ошибок при аллельной идентификации SNP-маркеров ограничивает плотность маркеров генетической карты некоторой величиной, не зависящей от объёма популяции.

рвать из оставшегося множества наиболее информативные (в указанном смысле) маркеры. Очевидно, чем больше окрестность, тем меньше остаётся маркеров, которые мы можем использовать при построении карты. Этот негативный эффект, сопровождающий процесс удаления огромного числа неинформативных маркеров, может быть уменьшен, если уменьшить радиус исключаемых окрестностей. Но при этом увеличивается количество ошибок в генетической карте, которое автоматически растёт с увеличением числа анализируемых маркеров.

2. Метод групп абсолютного сцепления (МГАС).

При использовании этого метода в качестве опорных маркеров выбирают только по одному представителю из каждой группы абсолютно-сцепленных маркеров за исключением, может быть, очень малочисленных групп. Остальные маркеры удаляются. Идея этого простого метода возникла в связи со следующей оценкой. Пусть объём популяции $N=100$. И пусть вероятность ошибочной идентификации $p=0.01$.

аллелей маркера m у i -ой особи равна

мального интервала длиной в 1сМ. Следовательно, в карте максимальной плотности не может быть больше 101 маркера. Другими словами, из 10000 маркеров в этой карте, по существу, будут только 100 маркеров, остальные с ними абсолютно сцеплены. Таким образом, для каждого маркера достаточная часть его «близнецов» будет безошибочной и, следовательно, абсолютно-сцепленной. Правда, совершенно случайно (с малой вероятностью) могут оказаться сцепленными ошибочные варианты маркера. Поэтому и вводится порог на отбор маркеров с достаточным числом абсолютно-сцепленных копий.

Результаты анализа моделируемых примеров.

1. Метод МО. На нескольких примерах, в первом из которых полностью отсутствует шум, а в трёх других мы данные первого примера подвергаем искажениям разной степени, анализируются результаты генетического картирования в случае, когда на хромосоме 10000 маркеров. Вначале смоделирована карта с 10000 маркерами типа ВС для популяции объёмом 100 особей. Из всей совокупности маркеров 99% имеют нулевое расстояние с соседними маркерами, 0.8% маркеров отстоят от одного из соседей на расстояние, которое распределено равномерно в интервале [0,2] сантиморгана. Оставшиеся 0.2% маркеров отстоят от одного из соседей на расстояние, распределённое равномерно в интервале [2, 6] сантиморгана. Таким образом, средняя длина построенной хромосомы. $L_{chr}=80x1cM+20x4cM = 160cM$. Построенная

карта оказалась состоящей из 60-ти опорных маркеров, остальные маркеры были абсолютно сцепленными с ними, поэтому их заранее удалили. В табл. 1 приводятся результаты построения генетической карты с зашумлёнными 10000 маркеров. В таблице приводятся результаты исследования зависимости качества построенной карты от величины окрестности опорного маркера и от уровня ошибок идентификации аллелей маркеров. В первом столбце указаны величины радиусов (*Rad*) окрестностей. Другие обозначения: % *ош. м.* – процент маркеров, в которых возможны ошибки идентификации аллелей; *вер.ош.* – вероятность неверной идентификации аллелей у данной особи; *к.оп.м.* – количество опорных маркеров; *к.м.к.* – количество маркеров итоговой карты; *длина* – длина карты в сМ; *чис. ош.* – число ошибок в построенной генетической карте.

Таблица 1. Зависимость качества построенной карты от величины окрестности опорного маркера и от уровня ошибок идентификации аллелей маркеров

| <i>Rad</i> | % <i>ош. м.</i> | <i>вер. ош.</i> | <i>к. оп. м.</i> | <i>к. м. к.</i> | <i>длина</i> | <i>чис. ош.</i> |
|------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| 0.08 | 90 | 0.01 | 34 | 22 | 202.5 | 0 |
| | 90 | 0.005 | 22 | 22 | 205.7 | 0 |
| | 50 | 0.01 | 33 | 23 | 209.5 | 0 |
| 0.04 | 90 | 0.01 | 340 | 49 | 277.4 | 7 |
| | 90 | 0.005 | 98 | 42 | 240.3 | 3 |
| | 50 | 0.01 | 207 | 36 | 225.9 | 2 |
| 0.03 | 90 | 0.01 | 792 | 45 | 236.2 | 8 |
| | 90 | 0.005 | 222 | 40 | 200.0 | 3 |
| | 50 | 0.01 | 437 | 44 | 220.0 | 3 |
| 0.00 | 0 | 0 | 60 | 53 | 149.5 | 0 |

Очевидным является наличие небольшого количества опорных маркеров, остающихся при выборе большой окрестности опорных маркеров, а также безошибочное их расположение в построенной генетической карте. Также очевидным является наблюдаемый рост числа опорных маркеров с уменьшением их окрестностей.

Увеличение почти вдвое числа ошибочных локусов увеличивает почти вдвое число опорных маркеров, идущих на построение генетической карты. Это происходит из-за того, что увеличение ошибок приводит к расхождению большего числа абсолютно сцепленных маркеров, т.е. происходит заметное увеличение числа различных маркеров. Увеличение вероятности

ошибок вдвое более чем в три раза увеличивает число опорных маркеров (*к.оп.м.*), идущих на построение генетической карты. Однако, последнее устранение «неустойчивых соседей» и маркеров, нарушающих монотонность, даёт в итоговой карте близкие количества маркеров (*к.м.к.*).

2. Метод МГАС. В следующей Табл. 2 приведены результаты, полученные этим методом на предложенном выше примере и его зашумлённых вариантах. В первом столбце таблицы показан нижний порог количества абсолютно-сцепленных маркеров (НПСЦ), превышение которого приводило к появлению соответствующего опорного маркера.

Таблица 2. Результаты исследований, полученные методом МГАС

| НПСЦ | % <i>ош. м.</i> | <i>вер. ош.</i> | <i>к. оп. м.</i> | <i>к. м. к.</i> | <i>длина</i> | <i>чис. ош.</i> |
|------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| 3 | 90 | 0.01 | 149 | 56 | 152.5 | 0 |
| | 90 | 0.005 | 134 | 55 | 151.5 | 1 |
| | 50 | 0.01 | 91 | 56 | 152.5 | 2 |
| 6 | 90 | 0.01 | 75 | 49 | 143.6 | 0 |
| | 90 | 0.005 | 65 | 53 | 151.5 | 0 |
| | 50 | 0.01 | 59 | 50 | 149.5 | 0 |
| 11 | 90 | 0.01 | 54 | 45 | 141.6 | 0 |
| | 90 | 0.005 | 54 | 45 | 141.6 | 0 |
| | 50 | 0.01 | 55 | 48 | 147.6 | 0 |
| | 0 | 0 | 60 | 53 | 149.5 | 0 |

Примечание. Нижняя строка таблицы совпадает с аналогичной строкой предыдущей таблицы.

Обсуждение. Технический прогресс последних лет позволил сравнительно недорого получать огромное количество полиморфных маркеров на геноме (SNIP-маркеры). Казалось бы, появилось всё необходимое для построения очень плотных генетических карт, но при этом возникли проблемы «утилизации» большого числа абсолютно сцепленных маркеров, разошедшихся из-за ошибок их генотипирования. Если бы не было этих ошибок, то задача автоматически сводилась бы к предыдущей, с числом маркеров на хромосому, отвечающим численности популяции. Очевидно, что в этом случае все маркеры разбиваются на группы абсолютно сцепленных маркеров, и по одному маркеру из каждой группы включаются в карту, а остальные удаляются. Теперь же мы имеем, кроме множеств абсолютно сцепленных маркеров, множество близких к ним маркеров, взаимное расположение которых может быть любым в зависимости от случившихся ошибок генотипирования. Этот факт и раньше имел место, но, в силу небольшой плотности карт, эти ошибки практически не влияли на порядок маркеров. Кроме решения этих проблем, потребовалась модернизация старых программных средств построения генетических карт, которые были способны переработать не больше сотен маркеров в хромосоме.

В работе рассмотрены два метода. Особенность первого метода, метода окрестностей (МО), состоит в случайном или не случайном последовательном выборе опорных маркеров, а также в удалении маркеров, находящихся в окрестностях заданного радиуса для каждого из последовательно выбираемых опорных маркеров. Генетическая карта, как и раньше, строится только по

опорным маркерам.

Второй метод, метод групп абсолютного сцепления (МГАС), сравнительно прост в своей реализации. В нем в качестве опорных маркеров выбирается только по одному представителю из каждой группы абсолютно-сцепленных маркеров за исключением, может быть, очень малочисленных групп. Остальные маркеры удаляются. Очевидно, второй метод является более точным, несмотря на его сравнительную простоту, но он работает в условиях, когда объём популяции соответствует уровню ошибок генотипирования. Полезными, в этом смысле, выглядят следующие простые рассуждения. При объёме популяции в 100 или 200 особей и при 1%-ном уровне ошибок генотипирования, который считается сейчас общепризнанным при получении SNP-маркеров, мы, в соответствии с формулой (1), будем иметь, соответственно, безошибочных 1/3 или 1/9 часть от общего количества абсолютно сцепленных маркеров. И если количество близнецов – три-четыре десятка, то метод МГАС обеспечит построение карты в первом случае с точностью до 1 сМ, а во втором – до 0.5 сМ.

Теперь, с целью увеличения плотности карты, рассмотрим популяцию из 1000 особей. Методом МО получим результат, при котором все близнецы из-за ошибок генотипирования разойдутся. МГАС в этом случае вообще перестаёт работать. Этот факт, в частности, говорит о принципиальной невозможности построить карту с плотностью 0.1 сМ, которую могла бы обеспечить популяция в 1000 особей. Причиной этого является высокий уровень ошибок генотипирования.

Выводы.

Появление SNP-маркеров, способных увеличить плотность существующих генетических карт, породило две основные проблемы. Первая проблема, техническая, связана с необходимостью обрабатывать значительно больший объём информации. Вторая проблема, алгоритмическая, ставит вопрос: как извлечь ожидаемые результаты? Представленная работа посвящена решению второй проблемы. Предлагаются два алгоритма построения генетических карт. Один направлен на построение карт, когда практически

отсутствуют абсолютно-сцепленные маркеры. Второй показывает, что при наличии множеств абсолютно-сцепленных маркеров карты могут быть построены с очень высокой точностью. Важным моментом является понимание того, что наличие определённого уровня ошибок при аллельной идентификации SNP-маркеров ограничивает плотность маркеров генетической карты некоторой величиной, не зависящей от объёма популяции.

Литература

1. Mester D., Ronin Y., Minkov D., Nevo E., Korol A. Constructing Large Scale Genetic Maps Using Evolutionary Strategy Algorithm // *Genetics*. – 2003 – Vol. 165. – P. 2269–2282.
2. Ronin, Y., D. Mester, D. Minkov, A.B. Korol. Building reliable genetic maps: Different mapping strategies may result in different maps // *Nat. Science*. – 2010 – Vol. 2. – P. 576–589.

RONIN Y.I., MINKOVA D.M., MESTER D.I., KOROL A.B.

University of Haifa, Institute of Evolution

Israel, 31905, Haifa, Mount Carmel, e-mail: efim@research.haifa.ac.il

METHODS OF GENETIC MAPPING USING SNP-MARKERS

Aims. The appearance of SNP-markers leads to the increasing of density of existing genetic maps and simultaneously has generated two major problems. The first problem is technical; associated with the processing of much more information. The second problem, algorithmic, raises the question: how to derive the expected results? **Methods.** Two algorithms of genetic mapping are proposed. One of them aims to maps building without any bound-together markers. It is based on the removing of all the markers from some area of chosen markers. The second method is applied when there are some groups of bound-together markers. It is based on the use of one representative from each set of bound-together markers. **Results.** Both methods allow solving of the problem; however the second method can only work at a reasonable population size, which does not lead to the total destruction of the sets of bound-together markers. Maps can be built by this method with very high precision. Moreover, this method uses earlier developed algorithms. **Conclusions.** Specified level of errors in the identification of alleles of SNP-markers limits the density of markers on the genetic map by some value that is independent of population size.

Key words: SNP-markers, genetic mapping, bound-together markers.

САХНО Л.А.¹, СЛИВЕЦ М.С.^{1,3}, ПЕТЕРСОН А.А.¹, КОРОЛЬ Н.А.², КАРБОВСКАЯ Н.В.², ОСТАПЧУК А.Н.², КУЧУК Н.В.¹

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины*

Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 148, e-mail: sakhno@icbge.org.ua

²*Институт микробиологии и вирусологии им. Заболотного НАН Украины*

Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 154

³*Национальный технический университет Украины «Киевский Политехнический Институт», Украина, , 03056, Киев, пр. Победы, 37*

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ РАПСА С ТРАНСГЕНОМ *CYP11A1* В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

В связи с меняющимися климатическими условиями важной становится такая характеристика растений как устойчивость к стрессовым

факторам различного происхождения.

Устойчивость к повреждающим воздействиям определяется в том числе и свойствами