

Н.Э. КОЖУХОВА, Ю.М. СИВОЛАП

Южный биотехнологический центр
в растениеводстве УААН и МОНУ, Одесса
natafolk@rambler.ru
genom2005@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ КУКУРУЗЫ



Представленные литературные данные и данные собственных исследований отражают последние достижения в области молекулярно-генетического анализа кукурузы и демонстрируют необходимость использования в генетике, селекции и семеноводстве кукурузы новейших ДНК-технологий.

© Н.Э. КОЖУХОВА, Ю.М. СИВОЛАП, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 5

Введение. Кукуруза одна из наиболее распространенных и продуктивных злаковых культур в мировом земледелии. Благодаря высокой продуктивности и универсальности использования кукуруза стала важнейшей зерновой и кормовой культурой современного земледелия. По темпам роста производства эта культура переместилась с третьего места (после риса и пшеницы) на первое [1].

Кукуруза (*Zea mays* L.) — модельный классический объект для изучения генетики окраски, изоферментов, мобильных диспергированных элементов, хлорофильных мутаций, биохимического состава зерна, признаков пола, цитоплазматических и мейотических мутаций, кроссинговера, различных транслокаций для картирования генов.

Генетические исследования кукурузы, начатые на рубеже XIX и XX вв., способствовали коренному ее улучшению и послужили основой для развития теоретической и прикладной генетики растений. Создание и внедрение в производство гибридной кукурузы — выдающееся достижение биологической науки XX века и пример плодотворности целенаправленных генетических исследований. Эта культура послужила моделью, на которой изучены и использованы в селекционной практике такие генетические явления, как гетерозис и цитоплазматическая мужская стерильность. Работки, осуществленные впервые на кукурузе, перенесены на другие культуры, что способствовало повышению общего уровня генетических исследований и селекционных технологий.

Молекулярные маркеры — современные инструменты для решения теоретических и практических проблем растениеводства. Отбор с их помощью (Marker Assisted Selection, MAS) позволяет на качественно новом уровне осуществлять селекционный процесс. Преимуществом его использования является возможность изучения генетического контроля признака, локализации соответствующего гена или генов в хромосоме. Для признаков, за которые отвечает один ген, использование MAS довольно просто, а в случае с количественными признаками, за которые отвечают несколько генов, складывается более сложная ситуация. Установлено, что гены, определяющие количественный признак, бывают сгруппированы в хромосоме в одном или несколь-

ких коротких отрезках, блоках, так называемых локусах количественных признаков (Quantitative Trait Loci, QTL). Гены в этих блоках находятся в генетической связи, потомству они передаются в совокупности, поэтому в этом случае также возможно использование MAS.

В последнее время термином MAS стали обозначать любое направление селекции, в какой-либо степени использующее молекулярные маркеры. Возможностям применения MAS в селекции и связанным с этим методическим вопросам уделяется большое внимание: локализованы гены и QTL многих агрономических свойств, в том числе урожайности, устойчивости к болезням. Сфера применения молекулярных маркеров в селекции и семеноводстве включает оценку генетического разнообразия, идентификацию генотипов, определение уровня гибридности, улучшение популяций. Работы отечественных и зарубежных ученых направлены также на углубленное исследование генома, молекулярно-генетическую природу гетерозиса, генетическое картирование. Украинские ученые были среди первых, кто применил в генетико-селекционных исследованиях биохимические (белковые) маркеры [2] и молекулярно-генетические, создаваемые в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3]. Широкое распространение в исследовании молекулярно-генетического полиморфизма получили полилокусные биаллельные доминантные маркеры типа RAPD, ISSR, IRAP, REMAP и монолокусные полиаллельные кодоминантные базирующиеся на микросателлитных последовательностях (SSR) маркеры [3].

Известно несколько направлений применения молекулярных маркеров в исследованиях кукурузы: оценка генетического разнообразия, идентификация и регистрация генотипов, изучение гетерозиса, маркирование локусов хозяйственно важных признаков.

Оценка генетических ресурсов кукурузы

В связи с прогрессирующим обеднением генофонда культурных растений сохранение и обогащение генного пула растений, в том числе кукурузы, является актуальной проблемой. Оценка генетического разнообразия исходного селекционного материала, характеристика

существующего генофонда, определение степени родства сортов требует наличия надежных и эффективных методов идентификации.

Мировые достижения в исследовании генетического потенциала кукурузы. Одна из первых работ по определению пригодности молекулярных маркеров, генерируемых в процессе ПЦР, для идентификации генотипов и детекции родства осуществлена на шести инбредных линиях и пяти простых гибридах кукурузы [4]. Авторы продемонстрировали возможность идентификации методом произвольно праймированной ПЦР. Чтобы достигнуть высокого уровня достоверности в определении родословных, авторы предложили использовать три-четыре праймера, позволяющих идентифицировать полиморфизм.

С использованием RAPD-маркеров проведена оценка потомств 24 инбредных линий кукурузы [5]. По данным кластерного анализа линии разделены на шесть групп; наибольшие генетические дистанции получены между зубовидными и кремнистыми линиями.

RAPD-ПЦР с 54 праймерами использовали для изучения генетического сходства 57 инбредных линий с различным типом эндосперма [6]. Полиморфизм между линиями детектирован при использовании 31 праймера. Значения коэффициента Джаккарта, выражающего генетическое сходство, составили на основе RAPD-данных 0,57—0,80 для отдельных пар линий. При этом у пар линий с различным эндоспермом оно было меньше. Анализ главных компонент разделит все линии на две группы по строению эндосперма. Корреляции между коэффициентом сходства f , вычисленного на основе метода педигри, и генетическим сходством на основе RAPD-данных были средними и не превышали 0,49.

Kantety et al. [7] с помощью ISSR-маркеров исследовали генетическое разнообразие представителей близких источников зародышевой плазмы — 19 линий лопающейся и 8 линий зубовидной кукурузы. В результате кластерного анализа линии сгруппированы соответственно их принадлежности к гетерозисным пулам.

Для исследования зародышевой плазмы кукурузы [8] использовали SSR-анализ 18 локусов, содержащих ди- и тринуклеотидные повторы. ПЦР-данные сравнивали с параметрами

изменчивости и генетической дивергенции, полученными при использовании ПДФ-маркеров. Подтверждена информативность микросателлитных маркеров для анализа генетического разнообразия кукурузы.

Для характеристики и идентификации 58 инбредных линий кукурузы Smith et al. [9] использовали ПЦР-анализ 131 SSR-локуса. Кластеризация линий соответствовала ожидаемой по данным о педигри.

Bohn et al. [10] определили вариабельность в наборе 31 инбредной линии кукурузы из разных гетерозисных пулов с помощью ПЦР-анализа 100 микросателлитных локусов. Идентифицировано 392 фрагмента, среднее значение индекса полиморфности составило 0,54. Ziegler et al. [11] исследовали генетическое разнообразие 93 инбредных элитных линий США и Европы по данным SSR-анализа. В результате разработан уникальный набор из 100 SSR-маркеров, включающий не менее двух маркеров на хромосомное плечо и средний индекс полиморфности 0,72.

Определение генетических дистанций среди современных и исторических инбредных линий кукурузы по данным ПЦР-анализа 83 микросателлитных локусов осуществляли для оценки того, насколько утеряно генетическое разнообразие современными генотипами [12]. Авторы отобрали восемь элитных инбредных линий, представляющих основу современного семеноводства США, и 32 другие инбредные линии, являющиеся исторически важными генотипами в селекции кукурузы. Результаты кластерного анализа хорошо согласовывались с информацией о родословных. Линии из гетерозисных групп BSSS, Рейд и Ланкастер сгруппировали в отдельные кластеры. Среднее число аллелей на locus составило 4,9 среди всех генотипов и 3,2 — среди современных линий. Уменьшение числа аллелей на locus не связано с разными размерами выборок. Значение средней генетической дистанции составило 0,65 среди современных линий, 0,67 среди исторических линий и 0,67 среди всех 40 генотипов. Авторы предположили, что генетическое разнообразие среди современных линий уменьшилось на генном уровне, но не на популяционном. Гибридная селекция кукурузы скорее сохраняет, чем уменьшает генети-

ческое разнообразие, по меньшей мере, во время первоначального разделения инбредных линий в BSSS и не-BSSS гетерозисные группы.

Проверку генетического сходства в пределах пяти групп кукурузы (Айодент, кремнистая, зубовидная (corn belt dent), сахарная и лопающаяся) осуществляли с использованием 218 SSR-маркеров [13]. Кластерный анализ продемонстрировал сходство между европейскими зубовидными линиями (F2, F7, EP1), CO109 и *su1*-линиями сахарной кукурузы США. Линия F64 из Аргентины отдалена от всех других. Закрытая проверка двух источников B37 показала, что версия Университета Purdue содержит набор аллелей, характерных для B73. Пять групп (Айодент, европейская кремнистая кукуруза, B73-зубовидная кукуруза, *su1*-сахарная кукуруза, лопающаяся кукуруза) показали устойчивые внутрigrупповые гаплотипы.

Enoki et al. [14] анализировали 60 микросателлитных локусов в выборке из 65 инбредных линий кукурузы, адаптированных к холодным регионам Японии. Кластерный анализ показал, что Северные кремнистые инбредные линии, селективируемые в Японии, сходны с канадской Северной кремнистой инбредной линией CO12 и европейской кремнистой линией F283, а также, что зубовидные инбредные линии, селективируемые в Японии, сходны с BSSS инбредными линиями, такими как B73. Эти ассоциации соответствуют известным записям родословных линий. Полученные результаты продемонстрировали эффективность SSR-анализа для оценки генетического разнообразия и соотношения к гетерозисным группам.

Для оценки разнообразия 20 пулов и популяций субтропической кукурузы, широко используемых в селекционных программах CIMMYT, Reif et al. [15] проанализировали 83 SSR-маркера. Отмечено, что родство между популяциями, полученное по данным SSR-анализа, прекрасно согласуется с информацией о педигри.

Le Clerc et al. [16] исследовали во временном аспекте генетическое разнообразие среди 133 современных и ранних сортов кукурузы, произрастающих во Франции в течение последних 50 лет, с помощью ПЦР-анализа 51 SSR-локуса. Сорта сгруппировали соответственно четырем периодам. Генетические различия сокра-

тились до 10 % в сортах селекции до 1976 г. сравнительно с сортами селекции после 1985 г. Незначительные различия отмечены среди сортов двух последних десятилетий, что должно настроить французских селекционеров кукурузы на расширение генетической основы в их селекционных программах.

С целью оценки потенциала нового поколения генетических маркеров — SNPs, обладающих высокой разрешающей способностью, для генотипирования зародышевой плазмы кукурузы создан проект «Maize Single Nucleotide Polymorphism» («DuPont» и «Pioneer», США) [17]. SNP-маркеры использовали для оценки генетического разнообразия среди 30 инбредных линий, представляющих коллекцию Североамериканской гермаплазмы кукурузы. Для ПЦР-амплификации использовали праймеры, последовательности которых разработаны на основе кДНК-клонов из EST-коллекции DuPont, и непосредственное секвенирование продуктов амплификации. Анализ ампликонов 20 локусов, произвольно распределенных в геноме, показал высокий уровень однонуклеотидного полиморфизма: одна единичная замена нуклеотида на каждые 70 п.н.; 60 % этих SNPs являлись транзициями и 40 % — трансверсиями. Детектировали одну вставку/делецию на каждые 160 п.н. В результате отобрали восемь линий кукурузы, которые представляли максимальное аллельное разнообразие в пределах оцененных генотипов, для каталогизации SNP-аллелей в 502 локусах, отобранных из ESTs и генов агрономического значения [18]. Полиморфными оказались 433 локуса, из них в 215 локусах идентифицировали инсерции/делеции (индели). Из 655 идентифицированных инделей однонуклеотидные характерны для более половины (54,8 %), также отмечены высокие частоты двух- и трехнуклеотидных инделей, а также инделей длиной шесть оснований (3,4 %) и восемь оснований (2,3 %). Вся информация о SNPs кукурузы собрана в созданной для этой цели базе данных — SNPBase.

Изучение генофонда кукурузы в Украине. В Украине исследование генетического разнообразия кукурузы с помощью ПЦР-маркеров начато в Южном биотехнологическом центре в растениеводстве (ЮБЦ) [19].

Предварительно осуществлен анализ наследования ПЦР-фрагментов в F_1 -гибридах кукурузы и возможность его прогнозирования, что имеет большое значение при выборе и оценке молекулярного маркера [20].

Проведено исследование генетического разнообразия 65 инбредных линий кукурузы зарубежной селекции и селекции Селекционно-генетического института разных гетерозисных групп с помощью RAPD- и SSR—ПЦР-методов [21—23]. Кластеризация генотипов на дендрограмме, сконструированной по данным ДНК-профилирования, в большинстве случаев совпала с ожидаемой группировкой по принадлежности к гетерозисным группам и по данным родословных. Генетические дистанции между линиями из разных гетерозисных групп были выше, чем между линиями из одной группы.

С помощью анализа 12 микросателлитных локусов исследовали 55 инбредных линий и 25 гибридов (простых межлинейных, двойных межлинейных и трехлинейных) селекции Института зернового хозяйства УААН (Днепропетровск), Селекционно-генетического института (Одесса) и мировой селекции с целью оценки генетического разнообразия исходного селекционного материала [24]. В результате ПЦР-анализа выявлены наборы аллелей, индивидуальные для каждого генотипа кукурузы, оценен дискриминационный потенциал использованной маркерной системы, осуществлен сравнительный анализ частот встречаемости аллелей и генотипов разных агроклиматических зон Украины.

Идентификация и регистрация генотипов кукурузы

Оценка генетического разнообразия вместе с информацией о родословной и основных полигенных агрономически важных признаках обеспечат объективную основу для описания генотипов и их регистрации. Либеризация рынка семян, создание в странах СНГ частных селекционно-семеноводческих предприятий усиливает необходимость контроля и охраны прав авторов коммерчески используемых сортов, линий, гибридов. Молекулярно-генетическая идентификация линий (точная, объективная, достаточно быстрая) необходима для

осуществления контроля генетической выравненности генотипов, установления их оригинальности и соответствия стандарту при обмене линиями между селекционными учреждениями.

Во многих странах созданы системы патентования, основой которых является тест на отличимость, однородность и стабильность (DUS-тест: distinct, uniform, stable — the DUS criteria). DUS-тест базируется на технических характеристиках (основных и дополнительных), подготовленных Международным союзом по защите новых сортов растений (UPOV — Union for the Protection of New Varieties of Plants), членом которого Украина стала в 1993 г. За последнее время в системе государственного сортоиспытания произошли значительные изменения, связанные с усовершенствованием методов изучения сортов и гибридов с учетом требований UPOV. В связи с широким обсуждением потенциала ДНК-профилирования как средства для описания DUS-признаков важных сельскохозяйственных культур в странах-членах UPOV возникла необходимость в детальной оценке возможности использования молекулярных маркеров для идентификации и регистрации сортов в Украине.

В ЮБЦ осуществлена теоретическая и практическая разработка технологии получения ДНК-маркеров, в частности SSR-маркеров, для демонстрации соответствия новых сортов критериям DUS-теста. Обоснование соответствия следующее.

Критерий отличимости. Анализ потенциально неограниченного количества микросателлитных локусов позволит идентифицировать заявленный сорт и тестировать его на отличие от остальных.

Критерий однородности. Генетически однородная линия будет иметь спектры идентичных гомозиготных аллелей микросателлитных локусов в пределах выборки индивидуальных образцов. Гибрид F₁ характеризуется идентичными спектрами аллелей каждого микросателлитного локуса в пределах выборки индивидуальных образцов (как в гомо-, так и в гетерозиготном состоянии) и объединяет аллели исходных родительских форм.

Критерий стабильности. ДНК зерен определенного сорта разных лет, репродукций и раз-

ных источников поставки должна иметь идентичные спектры микросателлитных локусов.

Разработанная в ЮБЦ методика идентификации и регистрации генотипов кукурузы представлена на VII сессии технической рабочей группы UPOV по биохимическим и молекулярным маркерам [25]. Для идентификации и регистрации генотипов использовали ПЦР-анализ 20 микросателлитных локусов. Выявлены наборы аллелей, индивидуальные для линий и гибридов. Аллельный состав SSR-локуса зафиксирован в виде генетической формулы генотипа как буквенно-цифровая запись кода локуса и размеров (в п.н.) аллелей данного локуса. Формула генотипа, составленная на основе SSR-анализа, отражает состояние конкретных микросателлитных локусов. Каждый SSR-локус кодировали буквой латинского алфавита. В качестве нижнего индекса использовали размер аллеля данного локуса (в п.н.). В случае гомозиготного состояния локуса указывали один аллель. Например, формула генотипа инбредной линии P502 выглядит следующим образом: A₁₄₂B₁₃₂C₁₃₂D₁₂₅E₈₃₂F₁₃₇G₁₈₂H₁₆₁I₁₁₀J₁₅₄K₂₂₀L₁₆₁M₁₉₈N₂₇₄O₁₁₅P₁₇₅Q₂₄₆R₉₅S₁₁₀T₂₉₀; формула генотипа простого гибрида Стожар: A₁₃₄A₁₄₂B₁₃₂B₁₄₄C₁₂₈C₁₃₂D₁₂₅E₈₂E₉₄F₉₇G₁₈₂G₁₈₇H₁₆₁H₁₆₈I₁₁₀I₁₁₅J₁₅₄K₁₂₂₀L₁₆₁L₁₆₅M₁₉₈M₂₀₆N₁₂₇₄O₁₁₅O₁₃₀P₁₆₇P₁₇₅Q₂₄₆R₉₅S₁₁₀T₂₉₀T₂₉₃.

Принципы идентификации и регистрации линий и гибридов кукурузы на основе ДНК-профилирования с помощью ПЦР защищены декларативным патентом Украины на изобретение [26—28] и представлены в методических рекомендациях [29], включающих описание метода, этапы анализа, обработку результатов. Выбранная маркерная система на основе микросателлитных локусов отвечает критериям, предъявляемым к индивидуализирующим маркерным системам: высокий уровень межсортной дискриминационной способности, достаточный охват генома, высокий уровень воспроизводимости. Представленная технология позволяет ввести в государственную практику Украины регистрацию сортов в виде генетических формул, контроль над соответствием сортов документации, проведения лабораторной сортовой апробации на любой фазе онтогенеза [30].

На основе полученных формул генотипов возможно и необходимо создание информа-

ционной базы данных или каталога инбредных линий и простых гибридов кукурузы «Реестра сортов растений Украины». В базе данных будут приведены характеристики исследованных локусов — хромосомная локализация, длина и состав повтора, количество и размеры аллелей в данной выборке и их частота встречаемости, значения индекса полиморфности. Такая база данных позволяет систематизировать получаемые данные, проводить тестирование аутентичности, унифицировать и обобщать информацию по генофонду кукурузы в Украине. База данных, позволяющая хранить и вести сравнительный поиск информации об исследованных генотипах, будет постоянно дополняться результатами анализа новых генотипов и новых микросателлитных локусов. Наличие такой информационной базы позволит осуществлять независимую экспертную оценку коммерческих партий семян и регистрировать новые генотипы с целью защиты прав селекционеров.

ДНК-маркеры в гетерозисной селекции кукурузы

Получение стабильно высоких урожаев зерна является актуальным для сельскохозяйственного производства. Успехи гетерозисной селекции кукурузы в значительной мере зависят от генетического разнообразия исходного материала, которое обуславливает физиологический потенциал данной культуры и способствует созданию высокоурожайных, адаптированных к природным зонам гибридов, обладающих эффективными системами защиты и улучшенным качеством зерна.

Подбор линий для гибридных комбинаций традиционно осуществляют на основе характеристики морфологических (фенотипических) признаков. Морфологические сравнения имеют такие ограничения, как субъективность в анализе признака; влияние среды или технологии возделывания на проявление признака; ограниченные различия между сортами близкородственного происхождения; возможность тестирования только на стадии взрослых растений и др. Эти ограничения, а также возрастающие масштабы селекции кукурузы инициируют разработку новых, более эффективных методов подбора исходных форм.

Наличие связи между генетической дивергенцией родительских форм и гетерозисом простых гибридов, показанное Моллом в 1962 г., послужило началом анализа корреляции между урожаем зерна F_1 -гибридов и генетическими дистанциями, полученными с использованием различных маркеров. В 1991 г. осуществлены теоретические расчеты линейной корреляции между показателями генетических дистанций линий, полученных на основе информации о маркерных локусах, и гетерозисом у соответствующих F_1 -гибридов и сделан вывод о том, что прогнозирование гетерозиса F_1 -гибридов на основе маркерных локусов может быть более эффективным, если маркеры отбирают по их родству к аллелям, связанным с желаемыми гетерозисными признаками [31].

ДНК-маркеры также использовали для демонстрации их прогнозирующего потенциала в гетерозисной селекции. Методами ПДРФ- и ПЦР-анализов исследовали генетический полиморфизм восьми линий кукурузы и провели корреляционный анализ уровня генетических дистанций между ними и показателями урожая соответствующих гибридов [32]. Коэффициент корреляции между урожаем гибридов и величиной генетических дистанций, рассчитанный по данным ПДРФ-анализа, составил 0,54 (достоверно при $P = 0,05$), при ПЦР-анализе — 0,60 (достоверно при $P = 0,01$).

Lanza et al. [33] оценили генетическое разнообразие 18 тропических инбредных линий кукурузы с помощью RAPD-ПЦР-техники с 32 праймерами. Определили корреляции между генетическими дистанциями, рассчитанными по данным ПЦР-анализа, и важными агрономическими признаками и гетерозисом простых гибридов. Полученные результаты продемонстрировали, что RAPD-маркеры могут быть использованы для отбора лучших комбинаций линий кукурузы, уменьшив, таким образом, число скрещиваний, требуемых для полевых оценок.

С помощью 23 SSR-маркеров Дринич и др. [34] проанализировали генетическую разнообразность в пределах 12 инбредных линий кукурузы и взаимосвязь генетических дистанций и гетерозиса 66 гибридов от скрещивания между ними. Коэффициенты корреляции между уро-

жаем зерна, специфической комбинационной способностью и гетерозисом по урожайности и генетической дистанцией положительны и, в основном, значительны, но их величина мала для прогнозирования величины гетерозисного эффекта на основе величины генетической дистанции. Авторы объясняют этот факт относительно небольшим числом произвольно отобранных маркеров и предлагают использовать маркерные локусы, связанные с QTL, которые влияют на гетерозис.

В ЮБЦ проведен ПЦР-анализ молекулярно-генетического разнообразия 15 инбредных линий кукурузы и оценка прогнозирующего потенциала ДНК-маркеров [35]. Согласно рассчитанным по данным ISSR-анализа значениям генетических дистанций (D) между линиями пары линий разделены на четыре группы: I — $D < 0,2$; II — $0,2 < D < 0,3$; III — $0,3 < D < 0,4$; IV — $D > 0,4$. В I группе генетические дистанции составляли от 0,033 до 0,182; во II группе — от 0,200 до 0,294; в III — от 0,300 до 0,399; в IV — от 0,412 до 0,538.

Авторы сравнили группировку исходных линий, осуществленную по значениям D , с распределением уровня гетерозиса. Среднее значение D I группы линий составило 0,091, II группы — 0,245, III — 0,353, IV — 0,460. Среднее значение H гибридов, полученных от скрещивания линий I, II, III и IV групп, составило 66, 78, 144 и 146 % соответственно. Коэффициенты корреляции r значений генетических дистанций между линиями и уровнем гетерозиса соответствующих гибридов следующие: 0,60; 0,46, 0,61 (достоверно при уровне значимости $P = 0,05$) и 0,41 (недостоверно) для линий I, II, III и IV групп соответственно. По мере увеличения значений генетических дистанций между исходными линиями наблюдается достоверное возрастание уровня гетерозиса соответствующих гибридов. С учетом низких значений генетических дистанций (до 0,300) между линиями возможна «выбраковка» близкородственных скрещиваний, а высокие значения генетических дистанций позволят прогнозировать получение высокогетерозисных гибридов.

SSR—ПЦР-анализ 20 микросателлитных локусов позволил получить индивидуальные для каждого генотипа наборы аллелей. Сравни-

тельный анализ аллельного состава SSR-локусов линии и среднего уровня гетерозиса гибридов, полученных от скрещивания данной линии со всеми остальными, показал достоверную корреляцию (уровень значимости $P = 0,05$) по девяти микросателлитным локусам.

При разделении линий на три группы по уровню гетерозиса соответствующих гибридов (I группа — гетерозис до 100 %; II группа — 100—150 %; III группа — выше 150 %) выявилась взаимосвязь аллельного состава SSR-локусов и уровнем гетерозиса, что дало возможность записать модельные генетические формулы «линии X» и «линии Y», предположительно обладающих разной комбинационной способностью. Если при генотипировании какой-либо линии аллельный состав по локусам A, B, C, K, M, R, S, U будет таким же, как у модельной «линии X» (при этом аллельный состав по остальным локусам может быть любым), возможно предположить, что для данной линии характерна низкая комбинационная способность. Аналогично, при совпадении аллельного состава какой-либо линии с аналогичным показателем «линии Y» данная линия будет обладать высокой комбинационной способностью.

Результаты генотипирования линий использовали для определения аллельного состава соответствующих гибридов, сравнив его с группировкой гибридов по уровню проявленного ими гетерозиса (I группа — гетерозис до 50 %; II группа — 50—100 %; III — 100—150 %; IV — выше 150). Отмечены достоверные корреляции ($P = 0,05$) между уровнем гетерозиса и аллельным составом по 7—11 SSR-локусам для разных групп гибридов. Для каждой группы гибридов отобраны наиболее часто встречающиеся сочетания аллелей исследованных локусов. Подсчитали корреляции между уровнем гетерозиса и сочетанием аллелей отдельных микросателлитных локусов. Коэффициент корреляции уровня гетерозиса и суммарного набора аллелей по 20 SSR-локусам составил 0,77 (достоверно при $P = 0,05$). Определили сочетание состава аллелей и состава локусов, характерное для определенной группы гибридов. Уникальное сочетание аллелей и локусов в предполагаемом гибриде, вычисленное по генотипам исходных линий, позволит отнести его в группу с определенным уровнем гетеро-

зиса, что исключит малоэффективные скрещивания.

Данный комплексный подход к прогнозированию уровня гетерозиса гибридов как по значениям генетических дистанций между исходными линиями, так и по аллельному составу микросателлитных локусов генотипов линий и гибридов позволит более целенаправленно подбирать родительские пары для получения высокогетерозисных простых гибридов. Представленная разработка защищена декларативным патентом Украины [36].

Маркирование локусов хозяйственно ценных признаков

Большое значение для улучшения культурных растений имеет картирование агрономически важных генов, в большинстве являющихся количественными (QTL). Внедрение молекулярных маркеров позволило развить методологию локализации и контроля локусов, определяющих количественные и качественные признаки.

Оценка компонентов урожая с помощью ДНК-технологий. Достижения по картированию QTL кукурузы довольно значительны: локусы, контролируемые урожаем зерна, структуру урожая, качество зерна, картированы на 40 экспериментальных популяциях в США и Европе [37–40]. Общие сведения о QTL роста и развития кукурузы содержат более 1200 локусов таких количественных признаков, как высота растения, дата цветения початка, жизнеспособность пыльцы, строение початка и размер зерна [41].

В результате так называемого «Иллинойского эксперимента», длящегося более 100 лет, с отбором на низкое и высокое содержание белка и жира в зерне кукурузы картированы многочисленные QTL для массы зерна и содержания в нем белка, крахмала и жира [42].

С помощью SSR-маркеров идентифицировано два QTL содержания составной части лизина — eEF1A [43]. Один из них сцеплен с зин-кодирующим локусом. С этих локусов транскрибировалось около 80 % первичного транскрипта данного белка. Есть сообщение о детекции QTL каротиноидов и токоферолов в популяции F_{2:3} с помощью 50 SSR-маркеров [44].

58 SSR-локусов анализировали по полной диаллельной схеме в выборке F₁-популяции, полученной от скрещивания восьми инбредных линий из разных географических регионов Индии [45]. Найдено 15 маркеров, имеющих связь с суммарным урожаем зерна, весом 100 зерен и общим количеством зерен в початке. Четыре информативных маркера на хромосоме 1 показали наиболее высокие генные эффекты на урожай и его компоненты. Маркеры bngl594 и bngl1360 на хромосоме 10 и bngl147 на хромосоме 1 показали высокие аддитивные эффекты на общий урожай зерна, масса 100 зерен и общее количество зерен в початке соответственно.

С помощью ПЦР-маркеров идентифицирован ген *ba1* (*barren stalk1*), который кодирует белок, необходимый для инициации развития всех боковых меристем у кукурузы [46]. На активности боковых меристем основана архитектура высших растений: боковые меристемы генерируют структуры ветвей и соцветий, которые и определяют полную форму растения. Архитектура кукурузы является главной целью как древних земледельцев, так и современных фермеров, так как влияет на сбор урожая, стратегию селекции и механизацию. Генетический полиморфизм *ba1* выражен в том, что в генный пул кукурузы входят два гаплотипа от ее дикого предшественника — теосинте, и только один введен в современные инбредные линии в результате отбора для агрономических целей.

Картирование устойчивости к неблагоприятным факторам. Применение ДНК-маркеров значительно расширило возможности оценки генов устойчивости к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам. Установлено, что гены устойчивости кукурузы к ржавчине (возбудитель *Puccinia sorghi*) Rpl расположены компактным кластером на коротком плече хромосомы 10. Состав кластера возможно искусственно изменять, и далее селекционер может манипулировать таким «сборным» кластером как одним геном устойчивости к большому числу биотипов патогена [47].

Осуществлена идентификация RAPD-маркеров, тесно сцепленных с геном устойчивости к вирусу карликовой мозаики кукурузы

[48]. Генетическое расщепление всех полиморфных маркеров, оцененное в F₃-поколении, соответствовало 3:1. Использовали 436 праймеров в двух пулах геномной ДНК из растений, гомозиготных по устойчивости к вирусу. На участке 25 сМ определены четыре RAPD-маркера. Фрагмент длиной 650 п.н., амплифицированный с использованием праймера ИВС376, тесно сцеплен с геном устойчивости.

Картированы QTL устойчивости кукурузы к вирусу мозаики сахарного тростника [49]. Действие двух картированных генов отслеживали на разных этапах развития растения. Авторы установили, что один из них действовал в основном на ранних этапах развития растения, а другой — в зрелом состоянии.

На хромосоме 9 определены QTL устойчивости к *Diatraea* spp., приводящих к потерям урожая кукурузы в тропических и субтропических регионах возделывания кукурузы [50].

Carson et al. [51] оценили устойчивость кукурузы к южной листовой милдью, вызываемой расой 0 *Cochliobolus heterostrophus*, с помощью генотипирования рекомбинантных инбредных линий от скрещивания линий Mo17 (устойчивая) и В73 (восприимчивая). Использовали ПЦР-анализ 234 микросателлитных локусов. Промаркировали семь QTLs на хромосомах 1, 2, 3, 4, 7 и 10 от устойчивой родительской линии Mo17 и дополнительный QTL на хромосоме 1 от восприимчивой родительской линии В73. Полученные результаты подтвердили полигенный характер наследования устойчивости к южной листовой милдью у кукурузы.

SSR-маркеры использовали в MAS-эксперименте по повышению засухоустойчивости в тропических линиях кукурузы CIMMYT Ac764355 (донор) и CML247 (реципиент) [52]. Исследован ряд локусов, картированных ранее с помощью ПДРФ-анализа, на наличие ПЦР-маркеров при передаче соответствующих геномных фрагментов от донорной линии реципиентной. Для этого скринировали 72 F₂-особи от скрещивания анализируемых линий. Большинство ПЦР-маркеров детектировало локусы, которые коассоциировались с соответствующими ПДРФ-локусами.

Исследования близкородственных линий существенно разными интервалами между цветением женских и мужских цветков, что

является индикатором засухоустойчивости, предприняты с целью идентификации молекулярных маркеров этих признаков [53]. Родительские и F₂-особи выращивали при разных режимах влажности для оценки морфологических различий. В результате RAPD- и ПДРФ-анализов выявлены стойкие различия между генотипами, ассоциированные с интервалом цветения, урожаем зерна и другими признаками.

В ЮБЦ установили корреляцию между расщеплением по полиморфным продуктам амплификации ДНК и локусами некоторых количественных признаков кукурузы по данным двух лет [54]. Объектом исследований служили 52 инбредные линии мировой селекции и линии селекции Селекционно-генетического института (г. Одесса). Шесть достоверных корреляций совпали по данным двух лет и представляют интерес для предварительного анализа селекционного материала.

Установлена корреляционная связь между аллельным составом SSR-локусов и некоторыми морфологическими признаками, что позволило получить четкие ДНК-характеристики генотипов как представителей определенной гетерозисной группы. Для маркирования локусов количественных признаков, отвечающих за развитие некоторых морфобиологических признаков кукурузы, использованы методы ISSR- и RAPD-анализа [55, 56]. Установлена специфичность аллелей маркерных локусов для определенных уровней фенотипического проявления полигенного признака. Показана возможность отбора ценных генотипов на основе определения аллелей маркерных локусов, связанных с необходимыми для селекции значениями признаков.

В электронной базе данных «Maize Genetics and Genomics Database» (www.maizegdb.org) суммированы результаты маркирования и картирования QTL таких признаков кукурузы, как масса 100 зерен, высота растения, содержание крахмала в зерне и абсцизовой кислоты в листьях, длина и ширина третьего листа, активность ADP-глюкозы, пирофосфорилазы и сахарозосинтазы, диаметр, масса и длина початка, содержание жира, лигнина в клеточных стенках, ранний рост и цветение, метаболизм углерода, устойчивость к кукурузному мотыльку и др.

Значительная часть результатов исследований, нашедших внедрение в практическую селекцию, и информации о QTL является собственностью коммерческих учреждений.

* * *

В заключение следует отметить, что молекулярная генетика стала мощным инструментом для решения многих задач эволюции, генетики, селекции, семеноводства, сохранения генофонда, идентификации генотипов и уточнения их происхождения. За сравнительно короткий для развития науки срок создана новая технология исследования молекулярно-генетического полиморфизма, основанная на генерируемых ПЦР-маркерах. Среди первых исследований, направленных на разработку технологий с использованием ПЦР-маркеров в анализе молекулярно-генетического полиморфизма кукурузы, были и наши работы. Высокая эффективность различных типов ПЦР-анализа способствовала его внедрению в сферу генетико-селекционных исследований в виде современных биотехнологий.

SUMMARY. The review represents the literature data and the data of personal research demonstrating the modern achievements in molecular-genetic analysis of maize (*Zea mays* L.). The importance of the use of DNA-technologies in genetics, breeding and seed-production of maize is shown. The examples of application of molecular-genetic markers in breeding process to increase its efficacy are demonstrated.

РЕЗЮМЕ. Наведено літературні дані та дані власних досліджень, що відображають новітні досягнення в області молекулярно-генетичного аналізу кукурудзи (*Zea mays* L.). Показано необхідність використання в генетиці, селекції і насінництві кукурудзи сучасних ДНК-технологій, зокрема тих, що засновані на методі полімеразної ланцюгової реакції. Надано приклади використання молекулярних маркерів в селекційному процесі, що дозволить здійснювати його на якісно новому рівні.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Циков В.С. Кукуруза: технология, гибриды, семена. — Днепропетровск : Зоря, 2003. — 296 с.
2. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его назначение в генетике и селекции — М.: Наука, 1985. — 270 с.
3. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е., Доменюк В.П., Белоусов А.О. ДНК-маркеры в селекции та насінництві кукурудзи // Вісн. аграр. науки. — 2003. — № 6. — С. 45—48.
4. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucl. Acids. Res. — 1991. — 18. — P. 7213—7218.
5. Kawata M., Yazaki S., Monma Y., Miura Y., Takaiwa F., Shimamoto Y., Ueta S. Pedigree assessment using random amplified polymorphic DNA markers in maize (*Zea mays* L.) // Grassland Sc. — 1995. — 41, № 3. — P. 251—255.
6. Hahn V., Blankenhorn K., Schwall M., Melchinger A. Relationships among early European maize inbreds. 3. Genetic diversity revealed with RAPD-markers and comparison with RFLP pedigree data // Maydica. — 1995. — 40, № 4. — P. 299—310.
7. Kantety R., Zeng X., Bennetzen J., Zenr B. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification // Mol. Breed. — 1995. — 1, № 4. — P. 365—373.
8. Taramino G., Tingey S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize // Genome. — 1996. — 39, № 2. — P. 277—287.
9. Smith J., Chin E., Shu H., Smith O., Wall S., Senior M., Mitchell S., Kresovich S., Ziegler J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree // UPOV Document BMT/4/2. — 1997. — 29 p.
10. Bohn M., Heckenberger M., Ziegler J., Joe L., Hauser J., Melchinger A. Variability within maize inbred lines determined with SSRs // Draft report on the Sixth Session of the working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular (BMT) of UPOV. Angers, France. 01—03.03.2000. Document BMT/6/13. Annex III. P. 1—4.
11. Ziegler J., Joe L., Hauser J., Fatmi A. Variability and repeatability of SSR markers in maize (*Zea mays* L.) // Draft report on the Sixth Session of the working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular (BMT) of UPOV. Angers, France. 01—03.03.2000. Document BMT/6/13. Annex III. P. 1—6.
12. Lu H., Bernardo R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds // Theor. Appl. Genet. — 2001. — 103. — P. 613—617.
13. Romero-Severson J., Smith J., Ziegler J., Hauser J., Joe L., Hookstra G. Pedigree analysis and haplotype sharing within diverse groups of *Zea mays* L. inbreds // Theor. Appl. Genet. — 2001. — 103, № 4. — P. 567—574.
14. Enoki H., Sato H., Koinuma K. SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan // Theor. Appl. Genet. — 2002. — 104. — P. 1270—1277.
15. Reif J., Melchinger A., Xia X., Warburton M., Hoisington D., Vasal S., Beck D., Bohn M. Use of SSRs for estab-

- lishing heterotic groups in subtropical maize // *Theor. Appl. Genet.* — 2003. — **107**, № 5. — P. 947—957.
16. *Le Clerc V., Bazante F., Baril C., Guiard J., Zhang D.* Assessing temporal changes in genetic diversity of maize varieties using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* — 2005. — **110**, № 2. — P. 294—302.
 17. *Rafalski A., Ching A., Bhatramakk D., Hainey C., Useche F., Palaisa K., Smith C., Tingey M., Tingey S.* Single nucleotide polymorphisms (SNPs) as tools for maize genetics and breeding // *CMBL.* — 2002. — **17**, № 2. — P. 803—810.
 18. *Bhatramakki D., Dolan M., Hanafey M., Wineland R., Vaske D., Register III J., Tingey S., Rafalski A.* Insertion-deletion polymorphism in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers // *Plant Mol. Biol.* — 2002. — **48**. — P. 539—547.
 19. *Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Вербицкая Т.Г., Брик А.Ф., Кожухова Н.Э., Солоденко А.Е., Чеботарь С.В., Балашова И.А., Барышева И.А., Топчиева Е.А.* Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях : Науч.-метод. руководство / Под ред. Ю.М. Сиволапа. — Киев : Аграр. наука, 1998. — С. 96—102.
 20. *Кожухова Н.Э., Солоденко А.Е., Сиволап Ю.М.* Исследование продуктов амплификации ДНК у F₁-гибридов кукурузы и подсолнечника // *Цитология и генетика.* — 1998. — **32**, № 4. — С. 26—31.
 21. *Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Асыка Ю.В.* Исследование генетических взаимоотношений у линий кукурузы при помощи RAPD и зеинов // *Цитология и генетика.* — 1997. — **31**, № 1. — С. 16—20.
 22. *Вербицкая Т.Г., Кожухова Н.Э., Гужва Д.И., Сиволап Ю.М., Соколов В.М.* Дифференциация линий кукурузы при помощи молекулярных маркеров // *Кукуруза и сорго.* — 1997. — № 6. — С. 7—11.
 23. *Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Вареник Б.Ф.* Идентификация инбредных линий кукурузы с помощью произвольно праймированной ПЦР и SSR-ПЦР // *Докл. РАСН.* — 1999. — № 6. — С. 3—6.
 24. *Ефименко В.Г., Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М.* Полиморфизм микросателлитной ДНК и изучение генетических ресурсов кукурузы // *Цитология и генетика.* — 2005. — **39**, № 2. — С. 10—15.
 25. *Kozhukhova N., Sivolap Yu.* Maize genotypes differentiation, identification and registration by SSR-markers // *Draft report on the Seventh Session of the working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular (BMT) of UPOV. Hannover, Germany.* 21—23.11.2001. Document BMT/7/19 Prov. Annex III. P. 11—15.
 26. *Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е.* Спосіб реєстрації генотипів кукурудзи // Деклараційний патент на винахід 62244А. Заявл. 07.02.2003. Опубл. 15.12.2003. Бюл. № 12.
 27. *Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е.* Спосіб встановлення типовості інбредних ліній кукурудзи // Деклараційний патент на винахід 65839. Заявл. 09.06.2003. Опубл. 15.04.2004. Бюл. № 4.
 28. *Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е.* Спосіб встановлення рівня гібридності у простих (міжлінійних) гібридів кукурудзи // Деклараційний патент на винахід 68814 А. Заявл. 30.10.2003. Опубл. 16.08.2004. Бюл. № 8.
 29. *Сиволап Ю.М., Волкодав В.В., Бальвіньська М.С., Кожухова Н.Е., Солоденко А.Е., Чеботарь С.В.* Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу микросателітних локусів : Метод. рекомендації. — Одеса, 2004. — 14 с.
 30. *Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е.* ДНК-технології в реєстрації і охороні прав на сорти рослин // *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин.* — 2005. — № 1. — С. 66—74.
 31. *Charcosset A., Lefort-Buson M., Gallais A.* Relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci: a theoretical computation // *Theor. Appl. Genet.* — 1991. — **81**. — P. 571—575.
 32. *Вербицкая Т.Г., Сиволап Ю.М., Соколов В.М.* Генетический полиморфизм линий кукурузы и его связь с продуктивностью гибридов // *Докл. РАСХН.* — 1997. — **4**. — С. 10—12.
 33. *Lanza L., Souza C. de, Ottoboni L., Vieira V., Souza A. de.* Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers // *Theor. Appl. Genet.* — 1997. — **94**, № 8. — P. 1023—1030.
 34. *Дринич М., Трифунович С., Дринич Г., Константинов К.* Генетическая дивергенция на основе SSR-молекулярных маркеров и прогнозирование гетерозиса кукурузы // *Кукуруза и сорго.* — 2003. — № 5. — С. 20—27.
 35. *Кожухова Н.Э., Вареник Б.Ф., Сиволап Ю.М.* Прогнозирующий потенциал ДНК-маркеров в гетерозисной селекции кукурузы // *Цитология и генетика.* — 2005. — **39**, № 1. — С. 14—20.
 36. *Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е.* Спосіб прогнозування гетерозису врожаю зерна простих гібридів кукурудзи // Деклараційний патент на корисну модель 7146. Заявл. 14.09.2004. Опубл. 15.06.2005. Бюл. № 6.
 37. *Lee M.* DNA markers and plant breeding programs // *Adv. Agron.* — 1995. — **55**. — P. 265—344.
 38. *Bretting P., Widrlechner M.* Genetic markers and plant genetic resource management // *Plant Breed. Rev.* — 1995. — **13**. — P. 11—86.
 39. *Stuber C.* Mapping and manipulating quantitative traits in maize // *Trends Genet.* — 1995. — **11**, 12. — P. 477—481.

40. Khavkin E., Coe E. Mapped genomic location for developmental functions and QTLs reflect concentered groups in maize (*Zea mays* L.) // Theor. Appl. Genet. — 1997. — 95, № 3. — P. 343—352.
41. Khavkin E., Coe E. The major QTL for plant stature, development and yield are general manifestation of developmental gene clusters // Maize Genet. Cooper. Newsletter. — 1998. — № 72. — P. 60—66.
42. Azanza F., Tadmor Y., Klein B. Quantitative trait loci influencing chemical and sensory characteristics of eating quality in sweet corn // Genome. — 1996. — 39. — P. 40—50.
43. Wang X., Carneiro N., Lopes J., Manolii V., Larkins B. QTL mapping of elongation factor 1-alpha (eEF1A) content and characterization of eEF1A genes in maize endosperm // Maize Genetic Conference Abstracts. — 2000. — 42. — P. 13.
44. Wong J., Lambert R., Rocherford T. Molecular marker mapping of chromosomal regions associated with carotenoids and tocopherols in maize // Maize Genetic Conference Abstracts. — 2000. — 42. — P. 36.
45. Mohammadi S., Prasanna B., Sudan C., Singh N. Study of chromosomal locations and gene effects on yield and yield components in maize using microsatellite markers // CMBL. — 2002. — 7. — P. 599—606.
46. Gallavotti A., Zhao Q., Kyozuka J., Meeley R., Ritter M., Doebley J., Pe M., Schmidt R. The role of barren stalk 1 in the architecture of maize // Nature. — 2004. — 432. — P. 630—635.
47. Hu G., Hulbert S. Construction of «compound» rust resistance genes in maize // Euphytica. — 1996. — 87, № 1. — P. 45—51.
48. Agrama H., Moussa M. Identification of RAPD markers tightly linked to the dwarf mosaic virus resistance gene in maize // Maydica. — 1996. — 41, № 3. — P. 205—210.
49. Duple C., Melchinger A., Kuntze L. Molecular mapping and gene action of Scm1 and Scm2, two major QTL contribution to SCMV resistance in maize // Plant Breeding. — 2000. — 119. — P. 299—303.
50. Sadler M., Weber G. Comparison between genetic and physical maps in *Zea mays* L. of molecular markers linked to resistance against *Diatraea* spp. // Theor. Appl. Genet. — 2002. — 104. — P. 908—915.
51. Carson M., Stuber C., Senior M. Identification and mapping of quantitative trait loci conditioning resistance to southern leaf blight of maize caused by *Cochliobolus heterostrophus* race O // Phytopathology. — 2004. — 94. — P. 862—867.
52. Hu X., Ribaut J., Gonzalez-de-Leon D. Development of PCR-based markers to facilitate large-scale screening in molecular maize breeding // Maize Genet. Cooper. Newsletter. — 1997. — 2. — P. 1—7.
53. Pons J., Arreola J., Gonzalez M., Martinez O., Simpson J. Determination of the molecular markers associated with the anthesis-silking interval in maize // Proc. Intern. Symp. — Vienna, 1995. — P. 237—244.
54. Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М., Вареник Б.Ф. Ассоциации продуктов амплификации ДНК с локусами, контролирующими некоторые хозяйственно ценные признаки кукурузы // Агробиотехнология растений и животных : Тез. докл. Международ. конф. — Киев, 1997. — С. 21—22.
55. Доменюк В.П., Белоусов А.А., Сиволап Ю.М. ДНК-маркирование количественных признаков кукурузы // Цитология и генетика. — 2002. — 36, № 6. — С. 9—15.
56. Доменюк В.П., Вербицкая Т.Г., Белоусов А.А., Сиволап Ю.М. Маркерный анализ количественных признаков кукурузы при помощи ISSR-ПЦР // Генетика. — 2002. — 38, № 10. — С. 1370—1378.

Поступила 04.01.06