

*На правах рукописи*

**СЕРГЕЕВ ДЕНИС АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ  
ПОЛИМОРФИЗМА ДНК РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ  
ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

03.00.12- физиология и биохимия растений,  
03.00.15-генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

ДУШАНБЕ- 2009

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии и геномной инженерии Института физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан

Научные руководители: доктор биологических наук,  
профессор

**Насырова Фируза Юсуфовна,**

кандидат биологических наук,  
доцент

**Хурматов Худойберды Хасанбоевич**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук  
**Исмоилов Махсатулло Исроилович,**  
Таджикский аграрный университет,

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
**Кадырова Дильбардзон Халиковна**  
Президиум Академии наук  
Республики Таджикистан

Ведущая организация:

Таджикский национальный  
университет

Защита состоится "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 2009 г. в \_\_\_ ч. на заседании диссертационного совета Д 047.001.01 при Институте физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан (734063, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2, e-mail: asrtkarimov@mail.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. И. Ганди Академии наук Республики Таджикистан.

Автореферат разослан "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук, доцент

Б.Б. Джумаев

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Мировые генетические ресурсы растений рассматриваются во всем мире как основной источник улучшения сельскохозяйственных культур на ближайшие десятилетия. Создание источников и доноров селекционно-важных признаков в большинстве случаев базируется на мировых генетических ресурсах или коллекциях культивируемых растений и их диких сородичей (Гончаров, 2002). В эффективности познания и использования генофонда важнейшая роль принадлежит методам исследования. Развиваемые молекулярно-биологические исследования ориентированы на решение теоретических и прикладных проблем интродукции, хранения, воспроизведения, идентификации, регистрации и паспортизации генетических ресурсов растений. Особое внимание должно быть уделено разработке эффективных методов для использования в сортоиспытании, селекции, семеноводстве и семенном контроле.

В настоящее время в области сравнительной генетики пшеницы интенсивно проводятся эксперименты с использованием молекулярных маркеров. Молекулярное маркирование (ММ) или генотипирование основано на полиморфизме, свойственным белкам и нуклеиновым кислотам. В результате таких исследований либо строятся практически лишённые функциональных генов карты, либо проводится "сравнительная привязка" того или иного гена разных видов к одним и тем же молекулярным маркерам (Конарев, 2002).

Считается, что стародавние сорта и местные формы сельскохозяйственных растений в результате длительного естественного и искусственного отбора лучше других приспособлены к локальным условиям произрастания и отличаются оптимальной для данной местности длиной вегетационного периода. Изучение местных сортов важно для геногеографических исследований, так как позволяет не только получить представление об основных характеристиках аборигенного материала того или иного вида, но и восстановить его филогенетические связи.

Важнейшей характеристикой популяций служит их внутривидовая генетическая изменчивость (полиморфизм) по дискретным качественным и количественным признакам. С использованием ДНК-маркеров связаны реальные практические достижения в идентификации и регистрации сортов важнейших сельскохозяйственных культур, в семеноводстве и семенном контроле.

Использование ДНК-маркерных технологий привлекает исследователей прежде всего возможностью работать с самим носителем наследственной информации. В работах многих исследователей последних лет справедливо отмечается, что разные ДНК-маркерные системы (в первую очередь, наиболее доступные, такие как RFLP, RAPD, AFLP) достаточно широко и эффективно используются для выяснения степени родства (или генетических связей) на внутривидовом и межвидовом уровнях (Liu, Tsunewaki, 1991; McIntosh et al., 1998; Khlestkina, Salina, 2001). Так, например, все проблемы идентификации и регистрации сортов (и генетических ресурсов растений, в целом), практические проблемы рациональной организации коллекций планируется решать исключительно с использованием ДНК-маркеров.

**Цель и задачи работы.** Цель работы - молекулярное маркирование ДНК стародавних и современных сортов рода *Triticum* L., собранных в различных природно-климатических регионах Таджикистана, а также идентификация их на основе молекулярного анализа генома.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. сбор семенного материала различных стародавних и современных сортов пшеницы, их фенотипическое описание;
2. использование молекулярных маркеров на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для анализа генетической вариабельности отобранных сортов и разновидностей мягкой пшеницы;
3. использование RAPD - маркеров для геномного анализа стародавних и современных сортов мягкой пшеницы Таджикистана;
4. использование SSR - маркеров (микросателлитов) для выявления полиморфизма ДНК сортов и разновидностей пшеницы;
5. определение генетического расстояния между сортами и разновидностями пшеницы и построение дендрограмм для выявления генетического сходства на основе геномного анализа.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** Впервые с использованием различных молекулярных маркеров проведен комплексный анализ стародавних и современных сортов пшеницы, выращиваемых на территории Таджикистана. На основе полученных данных определены уровни внутривидового полиморфизма и показаны различия по геномной вариабельности у всех изученных сортов. Полученные данные сопоставлены с данными о фенотипической изменчивости стародавних сортов пшеницы (Удачин, 1975). У исследованных стародавних сортов пшеницы выявлен внутривидовой

полиморфизм по всем использованным молекулярным маркерам и это свидетельствует об информативности данных маркеров. Впервые был проанализирован полиморфизм ДНК у стародавних сортов, выращиваемых на разных высотах над уровнем моря и в разных почвенно-климатических условиях Таджикистана. Полученные данные указывают на степень геномного полиморфизма стародавних и современных сортов и представляют интерес, так как могут использоваться в селекции как доноры хозяйственно-ценных признаков. В связи с этим практическую значимость имеют результаты, касающиеся изменчивости генов, ответственных за устойчивость к различным заболеваниям и неблагоприятным факторам среды. Подобранные нами методы и праймеры позволяют эффективно выявлять внутривидовую изменчивость у сортов и могут быть использованы в дальнейших селекционных исследованиях. Полученные результаты можно использовать для улучшения сортов сельскохозяйственных культур с применением методов молекулярных маркеров.

**Апробация работы.** Основные результаты исследования были доложены (или представлены) на: 6-м съезде физиологов растений РФ (Сыктывкар, 2006), на второй Центрально-Азиатской конференции по зерновым культурам (Иссык-Куль, Киргизия, 2006), конференции посвященной 120-летию Н.И.Вавилова "Вклад Н.И.Вавилова в изучение растительных ресурсов Таджикистана" (Душанбе, 2006), конференции посвященной 120-летию Н.И.Вавилова в ВИРе (Санкт-Петербург, 2006), семинаре лаборатории молекулярной генетики зерновых злаков Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (Новосибирск, 2007), конференции молодых ученых Академии наук Республики Таджикистана (Душанбе, 2007), конференции "Адаптационные аспекты функционирования живых систем" (Душанбе, 2007), конференции, посвященной 100 - летию профессора О.Ш. Шукурова (Душанбе, 2008), конференции, посвященной памяти академика АН Республики Таджикистан Ю.С. Насырова (Душанбе, 2008).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 работ.

**Структура и объём работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, заключения, выводов, списка литературы. Диссертация изложена на 132 страницах печатного текста, включая 12 таблиц, 2 схемы и 10 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 193 работы.

**Благодарность.** Экспериментальная работа выполнена при поддержке гранта Международного научно-технического центра №Т-1105.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 1. Объекты и методы исследований

#### 1.1. Объекты исследований

Работа проводилась в 2005-2008 гг. в Институте физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан (г. Душанбе).

Экспериментальная работа по RAPD - маркированию пшениц была разделена на два этапа. На первом этапе экспериментов RAPD - маркированию подвергались только местные стародавние сорта мягких пшениц. Второй этап состоял в RAPD - маркировании всех сортов и разновидностей пшениц вовлеченных в эксперименты. Такой порядок экспериментальных исследований был выбран исходя из того, что по известным опубликованным данным, выявленный внутривидовой полиморфизм по RAPD - маркерам находился на уровне, не позволяющем четко дифференцировать и идентифицировать исследованные образцы. Задачей являлся отбор из различных семейств и большого разнообразия ДНК- маркеров, позволяющих четко различать изученные сорта и генотипы.

На первом этапе материалом для исследования служили 14 стародавних местных сортов и два сорта современной селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*, геном AABBDD - гексаплоид), полученные из коллекции Института земледелия Таджикской Академии сельскохозяйственных наук и коллекции Института физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан.

Для расширенного анализа, который являлся вторым этапом исследований были отобраны 14 стародавних местных сортов мягких пшениц, два местных сорта современной селекции (Навруз и Хуросон), один сорт твердой пшеницы (АМР) и 15 сортов мягкой пшеницы современной селекции, в процесс выведения которых вовлекались зарубежные сорта (табл. 1). Для генотипирования был выбран 21 RAPD - маркер (олигонуклеотидные праймеры).

#### 1.2. Биохимические методы исследования

Для RAPD-анализа использовался набор из 21 олигонуклеотидного праймера длиной 10-11 нуклеотидов. Для SSR-анализа использовался набор праймеров длиной 20-22 нуклеотидов для выявления полиморфизма длины простых повторов ДНК. В случае необходимости анализа большого числа образцов выделение ДНК осуществляли, используя экспресс-метод, описанный Plaschke et al., (1996).

Режим ПЦР для произвольно амплифицированного полиморфизма ДНК (RAPD-анализ): денатурация при 94°C - 1 мин, 40 циклов - денатурация при 94°C 1 мин, отжиг праймера при 37°C - 1 мин, элонгация при 72°C - 2 мин. Режим ПЦР реакции для выявления полиморфизма простых повторов ДНК (SSR-анализ): денатурация при 94°C - 1 мин, 45 циклов - денатурация при 94°C - 1 мин, отжиг праймера при 50°C, 55°C, 60°C (температура отжига зависит от структуры праймера) 1 мин, элонгация при 72°C - 2 мин.

Для электрофоретического разделения продуктов ПЦР со случайными праймерами использовали 0,6-1 % агарозный гель, приготовленный на TAE-буфере с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0.01 мкг/мл. Разделение продуктов амплификации, полученных с праймерами к SSR-последовательностям, проводили в 10 % и 5 % ПААГ, соответственно. Документировали результаты электрофореза в системе Bio Doc. В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали гидролизат ДНК фага λ.

Таблица 1

Сорта пшениц, использованные в исследовании

<b>Наименование сортов и популяций</b>	<b>Место произрастания</b>	<b>Источник семенного материала</b>
Сафедак	Шугнанский р-н	Институт земледелия
Бобило	Рошткалинский р-н	Институт земледелия
Сурхак	Ванчский р-н	Институт земледелия
Руштак	Рошткалинский р-н	Институт земледелия
Сафедак	Бартагский р-н	Коллекция ИФРиГ
Килак	Бартагский р-н	Коллекция ИФРиГ
Навруз	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия

Сафедак	Рушанский р-н	Институт земледелия
Содирас (белый колос)	Афганистан	Коллекция ИФРиГ
Джалдак	Афганистан	Коллекция ИФРиГ
Сафедак	Ишкошимский р-н	Институт земледелия
Бобило	Ущелье реки Гунт	Коллекция ИФРиГ
Содирас (красный колос)	Афганистан	Коллекция ИФРиГ
Сурххуша	Ишкошимский р-н	Коллекция ИФРиГ
Сурхак	Шохдара	Институт земледелия
Хуросон	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Сабзак	Варзоб	Коллекция ИФРиГ
Тасикар	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Джагер	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Кауз	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Наз	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Ориен	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Зироат-70	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Садокат	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Сомони	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Безостая-1	Многие районы Таджикистана	Коллекция ИФРиГ
Замин	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Мира	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Киял	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Алтин-масак	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Алмалы	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Дельта	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия



Киргизская-100	Многие районы Таджикистана	Коллекция ИФРиГ
АМР	Многие районы Таджикистана	Коллекция ИФРиГ
Норман	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Уманка	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Алекс	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Ормон	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Аттила	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Ватан	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия
Шарк	Многие районы Таджикистана	Институт земледелия

Статистический анализ проводился на основе составления бинарных матриц по каждому из праймеров, в которых отмечалось "присутствие" (1) или "отсутствие" (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме. Каждый ПЦР-фрагмент рассматривался как отдельный генетический локус. Характер и степень изменчивости RAPD,SSR-маркеров анализировали в отношении праймера и образца. На основании суммарной матрицы RAPD и SSR-спектров с помощью программного пакета NTSYS pc V.2/11Q были определены генетические дистанции между исследуемыми образцами. Для построения дендрограммы, демонстрирующей филогенетические отношения между изученными образцами по результатам RAPD,SSR-анализа, применили метод невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием программы NTSYS pc V.2/11Q.

Таблица 2

Популяции пшениц, использованные в исследовании

<b>Популяции</b>	<b>Источник семенного материала</b>
Triticum aestivum var.erythrosperrum	Коллекция ИФРиГ АН РТ
Triticum aestivum var.erythrosperrum	Коллекция ИФРиГ АН РТ
Triticum aestivum var.erythrosperrum	Коллекция ИФРиГ АН РТ
Triticum aestivum var.erythrosperrum	Коллекция ИФРиГ АН РТ
Triticum aestivum var.erythrosperrum	Коллекция ИФРиГ АН РТ

## ГЛАВА 2. Результаты исследований

### 2.1. Геномный анализ по RAPD - маркерам

При проведении RAPD-ПЦР были использованы 17 эффективных произвольных праймеров (табл. 3), с помощью которых оценивали межсортовое и внутривидовое генетическое разнообразие *Triticum aestivum*. У изученных сортов по таким фенотипическим признакам, как окраска зерна, окраска колоса и остей, ломкость колоса и стебля, наблюдалось внутривидовое разнообразие. При электрофорезе основная зона разделения фрагментов находилась в пределах 2000-200 п.н. В целом, учитывалось 273 амплифицированных фрагментов, от 12 до 23 (в среднем 16) на один RAPD - праймер. Из 273 ПЦР - фрагментов 150 (55%) были полиморфны у изученных генотипов, 123 фрагмента (45%) имели одинаковую длину у всех изученных образцов. Самый высокий процент полиморфных RAPD - фрагментов - 14 из 16 (87%) был получен при амплификации ДНК с праймером R158. В то же время в случае RAPD - праймера 039 только 4 из 16 (25%) фрагментов были полиморфны. Этот праймер выявил наименьшее количество полиморфных локусов.

Таблица 3

RAPD - праймеры и характеристика выявляемых с их помощью ПЦР фрагментов (ампиконов)

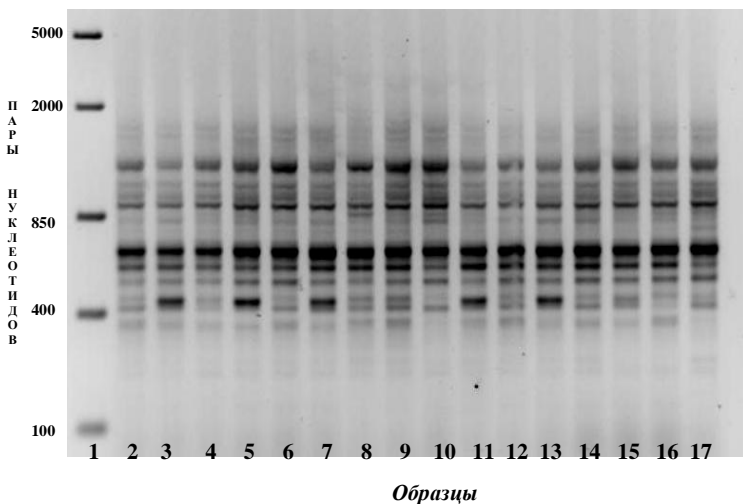
Символ	Количество ПЦР - фрагментов		
	общее	полиморфных	мономорфных
R031	17	11	6
R039	16	4	12
R058	14	9	5
R064	15	10	5
R068	23	17	6
R074	12	5	7
R082	16	6	10
R091	22	10	12
R156	12	6	6
R158	16	14	2
R159	19	11	8
R160	20	5	15
R177	18	12	6
R186	13	4	9

R342	13	5	8
R401	12	9	3
R565	15	12	3
<b>итого:</b>	<b>273</b>	<b>150</b>	<b>123</b>

Уровень полиморфизма, выявляемый при амплификации геномной ДНК с использованием остальных праймеров, имел промежуточное значение. С использованием всех праймеров в различных соотношениях установлено наличие как мономорфных, так и полиморфных фрагментов у исследуемых образцов. Мономорфные фрагменты могут считаться RAPD-маркерами для представителей вида. Чем больше генетическая дистанция между исследуемыми видами, тем меньше у них общих продуктов амплификации. Выявляемые при электрофорезе мономорфные полосы у различных сортов предполагают общность структурно-функциональной организации их геномов. Каждый из сортов имел свой определенный набор амплифицируемых RAPD - продуктов, отличающийся от других количеством фрагментов, их размером и степенью выраженности. Некоторые праймеры выявили присущие только одному конкретному сорту ампликоны и, следовательно, являются сортоспецифичными. Число суммарных зон, полученных при амплификации ДНК 16 изученных сортов пшеницы с каждым из праймеров, варьирует от 12 до 23. Отмечены существенные различия по количеству RAPD-фрагментов между изученными сортами. Исследуемые образцы различались также по числу уникальных, характерных только для одного сорта ампликонов.

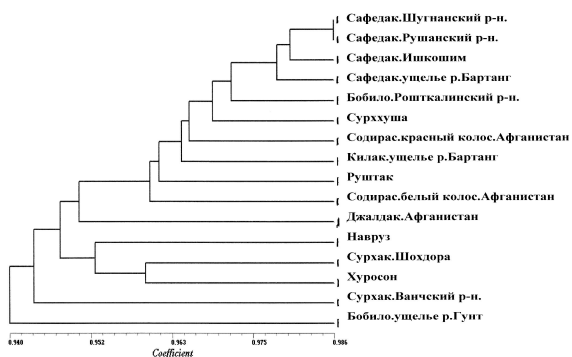
На рис.1 приведены результаты электрофоретического анализа продуктов ПЦР, полученных с праймером RAPD 158.

В случае использования праймера RAPD 158 выявлено всего 16 ПЦР - фрагментов длиной в пределах от 150 до 1900 п.н. При амплификации ДНК 16 образцов *T.aestivum* с данным праймером 14 ПЦР - фрагментов длиной около 1850, 1800, 1200, 1000, 950, 900, 840, 760, 740, 700, 650, 500, 320 п.н. являлись не полиморфными. RAPD - фрагмент длиной около 820 п.н. присутствует только у 17 образца (Хуросон, местный сорт *T.aestivum*), а фрагмент длиной около 390 п.н. отсутствует только у 10 образца (Содирас, белый колос.) сорт *T.aestivum* из Афганистана.. Эти фрагменты являются полиморфными, то есть выявляют внутривидовой и межсортовой полиморфизм.



**Рис.1** Электрофореграммы продуктов ПЦР с 158 RAPD - праймером в 2 %-ом агарозном геле. 1. линейка 2. Сафедак. Шугнанский р-н. 3. Бобило. Роиткалинский р-н. 4. Сурхак. Ванчский р-н. 5. Руштак. Роиткалинский р-н. 6. Сафедак. Ущелье р. Бартанг. 7. Килак Ущелье р. Бартанг. 8. Навруз. 9. Сафедак. Рушанский р-н. 10. Содирас, белый колос. Афганистан. 11. Джалдак. Афганистан. 12. Сафедак. Ишкошимский р-н. 13. Бобило. Ущелье р. Гунт. 14. Содирас, красный колос. Афганистан. 15. Сурххуша. Ишкошимский р-н. 16. Сурхак. Шохдара. 17. Хуросон.

По этим данным уровень внутривидового и межсортового RAPD-полиморфизма составляет 2 - 8 %, что объясняется преимущественно доминантным типом наследования этих маркеров. Для количественной оценки RAPD - полиморфизма и определения уровня дивергенции между изученными генотипами 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. На основе матрицы состояний невзвешенным парно-групповым методом кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) была построена дендрограмма генетического подобия между изученными образцами пшеницы (рис.2).



**Рис. 2.** Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между представителями вида *Triticum aestivum*, построенная на основании анализа генетических дистанций.

Уровень различий по величине генетического сходства между исследуемыми образцами варьирует от 0,99 (между популяциями сорта Сафедак из Шугнанского и Рушанского р-нов.) до 0,94 (между популяциями сорта Бобило). Из представленной дендрограммы видно, что образцы характеризуются сравнительно высоким уровнем межсортового полиморфизма. При этом коэффициент сходства между всеми сортами варьирует от 0,99 до 0,94. В целом, это сопоставимо с показателями геномного сходства, определенного с помощью других типов маркеров. Популяции сорта Сафедак из разных эколого-географических зон слабо морфологически обособлены друг от друга и иногда на основании морфологических данных отождествляются. По данным RAPD-анализа (значения бутстрепа 100%), сорта дифференцированы, несмотря на некоторую степень гомологии как по количеству, так и по размерам фрагментов. Как следует из представленной дендрограммы, правомерно объединить в одну группу популяции сорта Сафедак. Популяции сорта Сурхак и сорт Хуросон группируются вместе и наиболее близки в генетическом отношении к сорту Навруз. Наиболее удален в генетическом отношении сорт Бобило (популяции из ущелья р.Гунт).

Таблица 4

## Анализ RAPD- праймеров пшеницы

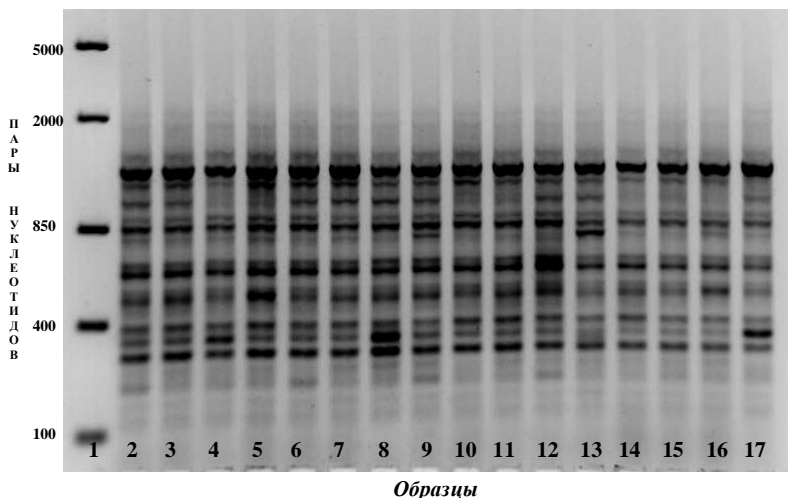
Праймеры	Количество ПЦР - фрагментов		
	общее	полиморфных	мономорфных
031	17	11	6
033	16	7	9
039	16	4	12
058	14	9	5
064	15	10	5
068	23	17	6
074	12	5	7
082	16	6	10
091	22	10	12
156	12	6	6
157	18	13	5
158	16	14	2
159	19	11	8
160	20	5	15
177	18	12	6
342	13	5	8
180	14	5	9
181	10	5	5
186	13	4	9
401	12	9	3
565	15	12	3
<b>Итого:</b>	<b>331</b>	<b>180</b>	<b>151</b>

Следует отметить, что в один кластер попадают сорта, значительно отличающиеся фенотипически (рис.2). Таким образом, молекулярно-генетический анализ дает возможность выявить специфические геномные маркеры, которые могут использоваться для сортовой идентификации генотипов. Показано, что метод молекулярного маркирования генома на основе RAPD-PCR позволяет идентифицировать представителей вида *Triticum aestivum* и установить филогенетические взаимоотношения между различными сортами. Целенаправленное использование видоспецифичных праймеров позволит исследователям сократить затраты труда и средств, необходимые для анализа коллекционных образцов.

Для генотипирования 32 сортов пшениц (табл.1) был выбран 21 RAPD - маркер (олигонуклеотидные праймеры). RAPD-анализ

характеризовался присутствием или отсутствием ПЦР - фрагментов (аллеля) у каждого образца. Эти сорта отличались по фенотипическим признакам, таким как окраска зерна, окраска колоса и остей, ломкость колоса и стебля. По этим признакам наблюдалось внутривидовое разнообразие. В ходе анализа при амплификации ДНК 32 образцов пшеницы с использованием 21 RAPD - праймера было выявлено 331 ПЦР - фрагмент, от 10 до 22 (в среднем 16) на один RAPD - праймер (табл. 4). Из 331 ПЦР - фрагмента 180 (54%) были полиморфны между изученными генотипами, 151 фрагмент (46%) имел одинаковую длину у всех изученных образцов. Самый высокий процент полиморфных RAPD - фрагментов - 14 из 16 (87%) был получен при амплификации ДНК с праймером R158. В то же время в случае RAPD - праймера 039 только 5 из 10 (50%) фрагментов были полиморфны (данные по всем праймерам приведены в табл. 4). Этот праймер выявил наименьшее количество полиморфных локусов. Уровень полиморфизма, выявляемый при амплификации геномной ДНК с использованием остальных праймеров, имел промежуточное значение.

На рис.3 приведены результаты электрофоретического анализа продуктов ПЦР, полученных с праймером RAPD 160. В случае использования праймера RAPD 160 выявлено всего 20 ПЦР - фрагментов длиной в пределах от 170 до 1850 п.н. При амплификации ДНК 32 образцов пшениц с данным праймером 15 ПЦР - фрагментов длиной около 1850, 1800, 1100, 1050, 980, 870, 840, 780, 740, 710, 630, 550, 410, 380, 350 п.н. являлись не полиморфными. RAPD - фрагмент длиной около 540 п.н. присутствует только у 16 образца (популяция сорта Сурхак из Шохдары, местный сорт *T.aestivum*), а фрагмент длиной около 900 п.н. отсутствует только у 14 образца отобранного из популяции сорта Содирас (красный колос) из Афганистана. Эти фрагменты являются полиморфными, то есть выявляют внутривидовой и межсортовой полиморфизм.



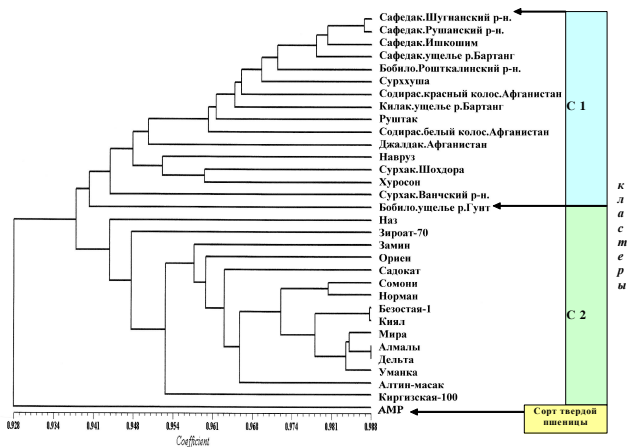
**Рис.3.** Электрофореграммы продуктов ПЦР с 160 RAPD - праймером в 2 %- ом агарозном геле. 1. линейка 2. Сафедак. Шугнанский р-н. 3. Бобило. Роиткалинский р-н. 4. Сурхак. Ванчский р-н. 5. Руштак. Роиткалинский р-н. 6. Сафедак. Ущелье р. Бартанг. 7. Килак Ущелье р. Бартанг. 8. Навруз. 9. Сафедак. Рушанский р-н. 10. Содирас, белый колос. Афганистан. 11. Джалдак. Афганистан. 12. Сафедак. Ишкошимский р-н. 13. Бобило. Ущелье р. Гунт. 14. Содирас, красный колос. Афганистан. 15. Сурххуша. Ишкошимский р-н. 16. Сурхак. Шохдара. 17. Хуросон.

Полученные нами результаты вполне согласуются с уже опубликованными ранее данными по RAPD - анализу различных геномов *T.aestivum* (Салина и др., 1997).

На основе полученных RAPD-спектров методом кластерного анализа были определены генетические расстояния между сортами и построена дендрограмма (рис. 4). Из представленной дендрограммы видно, что образцы характеризуются сравнительно высоким уровнем межсортового полиморфизма.

При этом коэффициент сходства между всеми сортами составляет от 0,98 до 0,77. В целом, это сопоставимо с показателями геномного сходства, определенного с помощью других типов маркеров.





**Рис. 4.** Дендрограмма генетических расстояний местных стародавних и современных сортов пшеницы по данным RAPD - маркирования.

Как и ожидалось, местные стародавние сорта кластеризовались в кластер С-1, коэффициент сходства этого кластера равен 0,94. В этот кластер вошли и два современных местных сорта Навруз и Хуросон. Это объясняется гибридным происхождением этих сортов, созданных на основе селекционных скрещиваний и отборов из местных стародавних сортов.

Второй кластер С-2 сформирован из сортов мягкой пшеницы зарубежной селекции. В этот кластер вошли современные селекционные сорта из различных регионов и природно - климатических зон Центральной Азии и России. Здесь внутрикластерный полиморфизм оказался намного выше, чем в кластере С1. Коэффициент сходства для кластера С-2 равен 0,94.

На значительном генетическом расстоянии от двух других кластеров (С1 и С2) находится сорт АМР. Это, по-видимому, связано с тем, что сорт АМР, относящийся к виду *T. durum*, не имеет в своем составе D-геном, присутствующий у мягких пшениц. Коэффициент генетического сходства равен 0,93. Эти показатели характерны для внутривидовых и межвидовых различий, выявляемых с помощью RAPD - маркирования.

## 2.2. SSR -генотипирование различных сортов пшеницы

Одним из наиболее распространенных методов ДНК - генотипирования является микросателлитный или SSR-анализ. Этот метод основан на использовании ПЦР со специфичными праймерами, которые расположены по краям микросателлитной области, состоящей из многократно повторяющихся единиц длиной от 2 до 6 пар нуклеотидов. Полиморфизм по микросателлитным последовательностям выражался в изменении их длины на одну или несколько пар нуклеотидов или, гораздо реже, в виде отсутствия продуктов амплификации отдельных образцов.

Для ПЦР использовали коллекцию идентифицированных микросателлитных маркеров. В табл. 5 представлены результаты анализа 22 сортов мягкой пшеницы с помощью 16 микросателлитных маркеров, имеющих разное число аллелей у изучаемых образцов.

Таблица 5

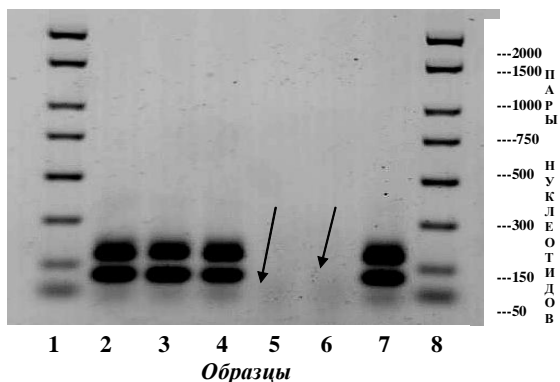
Количество SSR-фрагментов, выявленных у различных сортов *Triticum aestivum*

SSR - праймеры	Количество фрагментов				всего
	поли- морфных	моно- морфных	полиморфн ых %	мономорф- ных %	
wsp 003	2	0	100	0	2
wsp 006	7	0	100	0	7
wsp 044	5	0	100	0	5
wsp 046	3	0	100	0	3
wsp 058	4	0	100	0	4
wsp 082	0	1	0	100	1
wsp107	0	1	0	100	1
wsp120	4	4	100	0	4
wsp130	2	2	100	0	2
wsp156	3	3	100	0	3
wsp181	3	3	100	0	3
wsp186	2	2	100	0	2
wsp 192	2	2	100	0	2
wsp 325	1	1	100	0	1
wsp513	3	3	100	0	3
wsp 619	3	3	100	0	3
Итого:	44	2	95.7%	4.3%	46

Так, маркеры *Xgwm* 082, 107 были представлены только одним аллелем у всех 22 сортов, то есть в этих микросателлитных локусах отсутствует полиморфизм. Маркеры *Xgwm* 006, 044, 058, 120 были представлены 7, 5 и по 4 аллеля соответственно, то есть у каждого из проанализированных сортов в этих локусах имелся аллель, отличный от такового других сортов. Следовательно, эти сорта можно охарактеризовать и с использованием даже одного полиморфного маркера (например, *Xgwm* 006 - маркер), однако для оценки большего количества сортов необходимо использовать набор из нескольких микросателлитных маркеров, так как число аллелей, встречающихся на один микросателлитный маркер, ограничено.

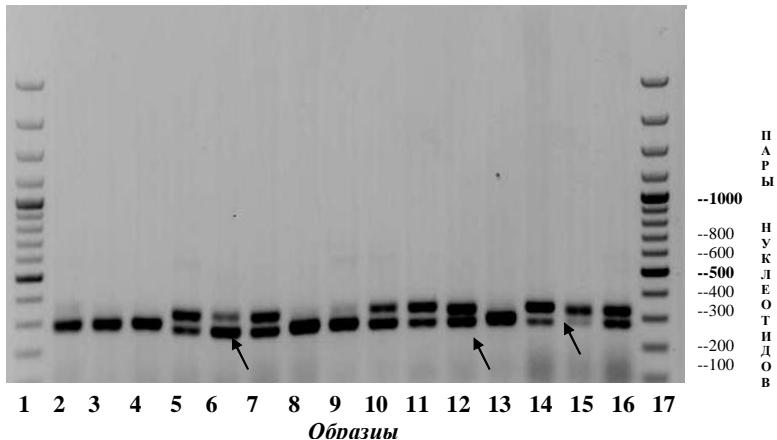
Наиболее оптимальным для молекулярно-генетической характеристики сортов мягкой пшеницы считается использование не менее 20 полиморфных микросателлитных маркеров, то есть примерно один маркер на одну хромосому. В наших исследованиях из 16 использованных маркеров только 14 выявили микросателлитный полиморфизм, следовательно, для оптимизации исследований межсортового полиморфизма необходимо проанализировать набор микросателлитных маркеров для отбора из их числа ещё 4 полиморфных SSR - маркеров. Подбор должен осуществляться исходя из следующих правил: 1) маркеры должны быть локализованы в разных хромосомах, 2) эти маркеры применялись ранее для оценки различных коллекций мягкой пшеницы. Увеличение числа микросателлитных маркеров на один сорт приводит к его более подробному молекулярно-генетическому описанию, но особенно не влияет на эффективность идентификации сорта. Однако в ходе работы может возникнуть необходимость увеличения количества микросателлитных маркеров, так как некоторые сорта (особенно при их большом количестве) неизбежно окажутся идентичными по всем выявляемым локусам.

При исследовании местных стародавних и современных сортов мягкой пшеницы на основе использования 16 SSR - маркеров был выявлен полиморфизм ДНК среди образцов. При этом количество аллелей на один маркер варьировало от 1 до 7. В некоторых вариантах встречались так называемые нулевые аллели, то есть отсутствие амплификации в определенных образцах (указано стрелкой, рис. 5).



**Рис. 5.** Электрофореграммы продуктов ПЦР с 044 SSR - праймером в 10 % - полиакриламидном геле. 1, 8. *Low ladder 50b.p.* 2. *Тасикар*. 3. *Джагер*. 4. *Кауз*. 5. *Алекс*. 6. *Ормон*. 7. *Амтила*.

Иногда у одного сорта выявлялись более чем один аллель, что можно объяснить наличием внутрисортовой гетерогенности (рис. 6, указано стрелкой).

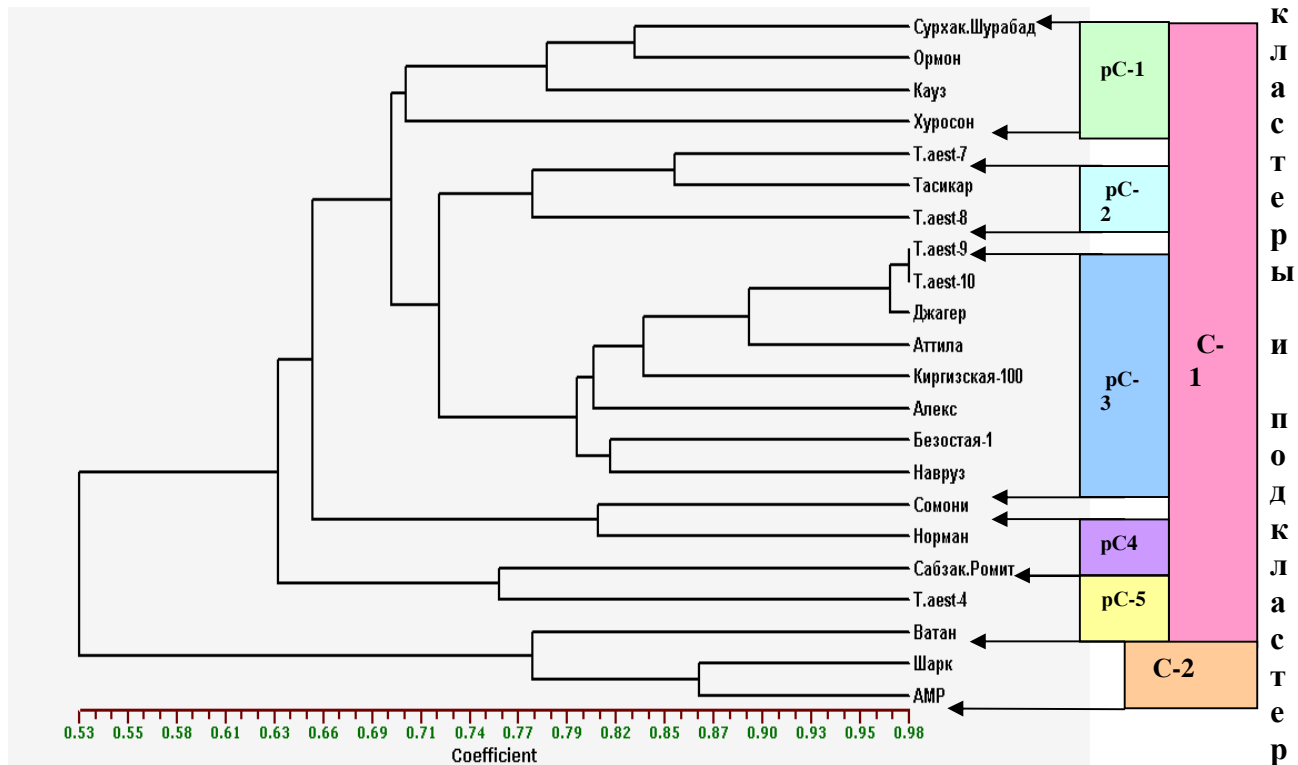


**Рис. 6.** Электрофореграммы продуктов ПЦР с 156 SSR - праймером в 10 % - ом полиакриламидном геле. 1, 17. *Low ladder 100 b.p.*; 2. *Сурхак*. *Шурабадский, р-н*. 3. *Сабзак*. *Ромит*. 4. *Хуросон*. 5. *T.aest.-1*. 6. *T.aest-3*. 7. *T.aest-4*. 8. *T. aest VIP-2*. 9. *T. aest. VIP-16*. 10. *T.aest. VIP-19*. 11. *T.aest VIP-18*. 12. *Безостая-1*. 13. *Киргизская-100*. 14. *AMP*. 15. *Сомони*. 16. *Наеруз*.

Кластерный анализ показал сложный характер генетических взаимосвязей изученных сортов и разновидностей пшеницы. Они объединились в две большие группы: С-1 и С-2 (рис.7). В группу С-1 включены кластеры рС-1, рС-2, рС-3, рС-4, рС-5 - с 19 сортами и разновидностями *T.aestivum*, происходящими главным образом из различных регионов Таджикистана. Помимо сортов мягкой пшеницы каждый из кластеров содержал представителей других разновидностей мягкой пшеницы. Была выявлена тенденция к объединению сортов, происходящих из одного и того же региона.

Таким образом, результаты анализа 16 микросателлитных локусов у 22 сортов и разновидностей двух видов пшеницы продемонстрировали высокий уровень генетического разнообразия этой культуры. В кластерном анализе изученный набор сортов на высшем иерархическом уровне разделился на две группы - С-1 и С-2, представляющие мягкую и твердую пшеницу. Такое деление, возможно, отражает два основных пути эволюции и географического распространения пшеницы и имеет аналогию с разделением пшениц на "группы рас", которые предложил Н.И. Вавилов (1922-1923) или на подвиды (Фляксбергер, 1935; Цвелев, 1976; Дорофеев и др., 1979). На более низком иерархическом уровне сорта и разновидности объединились в отдельные кластеры, которые включали не идентичные разновидности мягкой и твердой пшеницы. Ни одна из разновидностей гексаплоидной пшеницы не образовала самостоятельного кластера. Классификация сортов разных видов гексаплоидной пшеницы, основанная на результатах анализа микросателлитных локусов, отличается от известных ботанических классификаций этого комплекса пшениц. В значительной степени она совпадает с делением мягкой пшеницы на подвиды, которые предложил Н. И. Вавилов (1964) на основе обобщения данных эколого-географического изучения пшеницы. Основное отличие состоит в том, что кроме мягкой пшеницы местные сорта других видов гексаплоидной пшеницы входят в состав групп, соответствующих указанным выше подвидам.

**Рис. 7.** Дендрограмма генетических расстояний местных стародавних и современных сортов пшеницы по данным SSR-маркирования.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-биологические и биохимические методы (ДНК-гибридизация, иммунохимические методы, электрофорез белков) были на первом этапе применимы для анализа родства видов и геномов, ревизии схем филогении и происхождения геномов, созданных на базе классических, в том числе цитогенетических методов.

Целью нашей работы была оценка взаимоотношений между различными современными и стародавними сортами пшеницы по полиморфизму фрагментов ДНК, амплифицированных в полимеразной цепной реакции с RAPD и SSR - праймерами. Полученные результаты позволили разделить изученные сорта и местные популяции на основные группы, которые, очевидно отражают основные тенденции эволюции и географического распространения пшеницы.

Впервые с использованием RAPD и SSR ДНК- маркеров проведен молекулярный геномный анализ современных и стародавних сортов мягкой и твердой пшеницы (*Triticum aestivum*-геном AABBDD, *Triticum durum* - геном AABB), культивируемых на территории Таджикистана и определен уровень их филогенетического родства.

Методом RAPD-анализа изучена степень родства между образцами гексаплоидных пшениц разных эколого-географических групп (32 образца из коллекции). Показано, что, чем больше генетическая дистанция между исследуемыми видами, тем меньше у них общих продуктов амплификации. Некоторые праймеры выявили присущие только одному конкретному сорту ампликоны и, следовательно, являются сортоспецифичными. Число суммарных зон, полученных при амплификации ДНК 32 изученных сортов пшеницы с каждым из праймеров, варьирует от 12 до 23. Отмечены существенные различия по количеству RAPD-фрагментов между изученными сортами. Исследуемые образцы также различались по числу уникальных и, в то же время, характерных только для одного сорта ампликонов.

Впервые проведен сравнительный RAPD-анализ геномов различных сортов и разновидностей мягкой и твердой пшеницы, который характеризовался неодинаковым количеством фрагментов и их размером у изученных генотипов. Для каждого генотипа было характерно наличие определенного количества RAPD - фрагментов, которое являлось основным критерием различия изученных образцов.

С использованием RAPD - анализа выявлены различия между стародавними сортами мягкой пшеницы и их разновидностями,

происходящими из различных эколого-географических зон Таджикистана, которые по морфологическим и фенотипическим признакам мало дифференцированы и в некоторых случаях отождествлялись.

Исследования проводились также в связи с возможностью маркирования генотипов с высоким уровнем устойчивости к стрессовым факторам внешней среды. Результаты координатного и кластерного анализа этих данных продемонстрировали, что все изученные образцы гексаплоидных пшениц представляют собой единый генный пул, который делится на два больших кластера. Удалось идентифицировать праймеры, позволяющие выделять группы образцов с определенными фенотипическими характеристиками. Основная зона разделения ДНК - фрагментов находилась в пределах 2000-200 п.н. В целом, учитывался 331 амплифицированный фрагмент. Из 331 ПЦР - фрагмента 54% были полиморфны между изученными генотипами, 46% имели одинаковую длину у всех изученных образцов, а значит являлись мономорфными. Это свидетельствует о перспективности данного подхода к анализу коллекций как исходного материала для селекции по важнейшим признакам.

Анализ межвидового (междугеномного) родства имеет значение не только для решения вопросов филогении и систематики, но, главным образом, для селекции, базирующейся на методах отдаленной гибридизации.

Выявляемые при электрофорезе продуктов ПЦР мономорфные полосы у различных сортов более четко обозначают общность структурно-функциональной организации их геномов. При этом каждый из изученных сортов имеет свой определенный спектр амплифицируемых RAPD - продуктов (фрагментов), отличающийся от других по их количеству, размеру и степени выраженности. Анализ полученных результатов, представленных в виде дендрограммы коэффициентов генетического сходства, показал, что изученные сортообразцы характеризуются сравнительно высоким уровнем межсортового полиморфизма. При этом уровень различий по величине генетического сходства между исследуемыми образцами, наиболее близкими в генетическом отношении варьирует от 0,98 до 0,97 (между популяциями сорта Бобило), а коэффициент сходства между всеми сортами составляет от 0,99 до 0,77.

На основании данным RAPD-анализа сорта дифференцированы, несмотря на некоторую степень гомологии, как по количеству, так и по размерам фрагментов. В связи с этим анализ коэффициентов генетического сходства дал возможность правомерно объединить в



одну группу популяции сорта Сафедак из различных эколого-географических зон Таджикистана. Популяции сорта Сурхак и сорт Хуросон группируются вместе и наиболее близки в генетическом отношении к широко распространенному сорту Навруз. Наиболее удален в генетическом отношении сорт Бобило (популяция из ущелья реки Гунт).

Возможность изменений генетической конституции образцов, происходящих посредством мутаций, селекции, случайного дрейфа или засорения, делает необходимым проведение контроля над генетической целостностью - подлинностью, чистотой хранимого (и периодически пересеваемого) материала. Проблема идентификации дублетов и так называемых очень сходных образцов, возможно, найдет решение посредством молекулярных технологий. Накопление большого опыта по использованию ДНК-спектров необходимо для анализа динамики популяций перекрестноопыляющихся культур (и генотипического состава самоопыляющихся) в процессе репродукции образцов.

В различных генетических и селекционных коллекциях сохраняется большое число образцов стародавних местных сортов мягкой озимой пшеницы и других местных сортов и форм. Было показано, что стародавние сорта, сорта народной селекции имеют более высокий уровень популяционного полиморфизма по сравнению с современными сортами, что делает их ценным источником генетического разнообразия для улучшения современных сортов. Концентрация доминирующего генотипа в популяции может значительно варьировать, изменяя, таким образом, генотипный состав популяции.

Так, нашими исследованиями по SSR - генотипированию 22 стародавних сорта мягкой пшеницы, которые являются в основном популяциями, было показано, что набор из 16 микросателлитных маркеров выявил разное число аллелей у изучаемых образцов. Кластерный анализ показал сложный характер генетических взаимосвязей изученных сортов и разновидностей пшеницы. Они объединились в две большие группы: С-1 и С-2. Группа С-1 включает кластеры рС-1, рС-2, рС-3, рС-4, рС-5 - с 19 сортами и разновидностями *T.aestivum*, происходящими главным образом из различных регионов Таджикистана. Помимо сортов мягкой пшеницы каждый из кластеров содержал представителей других разновидностей мягкой пшеницы. Была выявлена тенденция к объединению сортов, происходящих из одного и того же региона. Таким образом, результаты анализа 16 микросателлитных локусов у 22 сортов и

разновидностей двух видов пшеницы продемонстрировали высокий уровень генетического разнообразия этой культуры. На более низком иерархическом уровне сорта и разновидности объединились в отдельные кластеры, которые включали не идентичные разновидности мягкой и твердой пшеницы. Ни одна из разновидностей гексаплоидной пшеницы не образовала самостоятельного кластера. Классификация сортов разных видов гексаплоидной пшеницы, основанная на результатах анализа микросателлитных локусов, отличается от известных ботанических классификаций этого комплекса пшениц. В значительной степени она совпадает с делением мягкой пшеницы на подвиды, которые предложил Н. И. Вавилов (1964) на основе обобщения данных эколого-географического изучения пшеницы. Основное отличие состоит в том, что кроме мягкой пшеницы местные сорта других видов гексаплоидной пшеницы входят в состав групп, соответствующих указанным выше подвидам.

## ВЫВОДЫ

1. Методами RAPD - анализа выявлены фрагменты генома *Triticum aestivum* (AABBDD) в геноме *Triticum durum* (AABB). 22 ампликона размером 1240, 1190, 1035, 980, 760, 540, 475, 460, 450, 435, 420, 380, 345, 320, 315, 285, 240, 220, 185, 170, 145, 135 п.н., выявляемые при амплификации с праймерами R 033, 186, 064, 082, 177, 342, 565, были идентифицированы как в геноме мягких, так и твердых пшениц из различных эколого- географических регионов Таджикистана, что дало возможность подразделить фрагменты ДНК на видоспецифичные и сортоспецифичные.

2. Определена степень межсортowego полиморфизма староместных сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*, геном AABBDD), произрастающих на территории Таджикистана, на уровне микросателлитных (SSR) простых повторов генома. Коэффициент генетического сходства между исследуемыми образцами варьирует от 0,99 (между популяциями сорта Сафедак) до 0,94 (между популяциями сорта Бобило).

3. Показано, что основная зона разделения ДНК - фрагментов при RAPD - анализе находилась в пределах 2000-200 п.н. Из 331 ПЦР - фрагмента - 54% были полиморфными между изученными генотипами, 46% имели одинаковую длину у всех изученных образцов.

4. Установлено, что RAPD-фрагмент полученный при амплификации с праймером 158 длиной около 820 п.н. присутствует

только у образца сорта Хуросон, а фрагмент длиной около 390 п.н. отсутствует только у образца сорта Содирас. Это говорит о том, что эти фрагменты являются полиморфными и выявляют внутривидовой и межсортовой полиморфизм.

5. Результаты кластерного анализа полученных нами данных показали, что все изученные образцы гексаплоидных и тетраплоидных пшениц представляют собой единый пул, который делится на три кластера. Кластер С-1 образован стародавними сортами мягкой пшеницы, в кластер С-2 входят современные селекционные сорта мягкой пшеницы, и отдельно представлен сорт твердой пшеницы.

6. Степень генетической близости между сортами рода *Triticum* по RAPD - маркерам характеризуется следующим: староместные и современные селекционные сорта *Triticum aestivum* (геном AABBDD) образуют общий кластер по RAPD - маркерам, вид *Triticum durum* (геном AABB) образует связь с этими кластерами на значительном генетическом расстоянии.

7. По данным RAPD - и SSR - маркирования наиболее полиморфными являются современные селекционные сорта, а староместные отличаются меньшим уровнем межсортового полиморфизма, так как они не вовлекались в активный селекционный процесс и были территориально обособленными.

8. При анализе 22 сортов мягкой пшеницы с помощью 16 микросателлитных маркеров, имеющих разное число аллелей у изучаемых образцов, показано, что SSR - маркеры (*Xgwm* 082, *Xgwm* 107) представлены только одним аллелем у всех 22 сортов, то есть в микросателлитных локусах этих генотипов отсутствует полиморфизм. Однако, SSR - маркеры (*Xgwm* 006, *Xgwm* 044, *Xgwm* 058, *Xgwm* 120) представлены по 7, 5 и 4 аллелям, соответственно, то есть у каждого из проанализированных сортов в этих локусах имеется аллель, отличный от такового у других сортов. Это свидетельствует о сортоспецифичности этих аллелей.

### **Список опубликованных работ по теме диссертации**

1. Хурматов Х.Х., Сергеев Д.А., Салина Е.А., Хлесткина Е.К. Насырова Ф.Ю., Алиев К.А. RAPD SNP анализ генома пшеницы и диких сородичей зерновых злаков Таджикистана // Известия АН Республики Таджикистан. Отд. биол. и мед. наук. 2006. № 1 (154). С. 18-24.

2. Хурматов Х.Х., Сергеев Д.А., Хлесткина Е.К., Салина Е.А., Насырова Ф.Ю., Алиев К.А. Анализ генома пшеницы и диких сородичей зерновых злаков Таджикистана с помощью молекулярных

маркеров // Депонированная рукопись №03(1720) от 30.03.06. НПИЦ. Душанбе.

3. Сергеев Д.А., Гулов М.К., Хурматов Х.Х., Насырова Ф.Ю. Применение ДНК маркеров в изучении генома злаковых культур, произрастающих в Таджикистане // Материалы конференции молодых ученых АН РТ Душанбе. 2007. С. 121.

4. Сергеев Д.А., Хурматов Х.Х., Наимов С.Н., Насырова Ф.Ю. Применение микросателлитного анализа в изучении полиморфизма ДНК культурных злаков // Адаптационные аспекты функционирования живых систем. Материалы Республиканской конференции. Душанбе. 2007. С. 120-123.

5. Хурматов Х.Х., Кавракова З.Б., Файзиева С. А., Гулов М.К., Сергеев Д. А., Наимов С.Н., Насырова Ф.Ю. Анализ генетического разнообразия рода эгилопс с помощью молекулярных маркеров // Адаптационные аспекты функционирования живых систем. Материалы Республиканской конференции. Душанбе. 2007. С. 154-158.

6. Хурматов Х.Х., Сергеев Д.А., Кавракова З.Б., Файзиева С., Наимов С., Насырова Ф.Ю. Молекулярные маркеры ДНК в генетико-популяционных исследованиях // Известия Академии наук Республики Таджикистан. Душанбе. 2007. № 2(158). С. 32-37.

7. Наимов С., Нигмонов М., Насырова Ф.Ю., Касимова Г.Ф., Хурматов Х.Х., Донцова С.В., Кавракова З.Б., Файзиева С.А., Сергеев Д.А., Гулов М.К., Алиев К.А., Рахматов А.С., Кичитов В.К. Каталог видов и образцов рода *Aegilops L.*, собранных в различных эколого-географических зонах Таджикистана // Институт физиологии растений и генетики Академия наук Республики Таджикистан. 2007.

8. Наимов С., Нигмонов М., Насырова Ф.Ю., Касимова Г.Ф., Хурматов Х.Х., Донцова С.В., Кавракова З.Б., Файзиева С.А., Сергеев Д.А., Гулов М.К., Алиев К.А., Рахматов А.С., Кичитов В.К. // Авторское свидетельство № 048ТJ. 2007.

9. Хурматов Х.Х., Сергеев Д.А., Кавракова З.Б., Салина Е.А., Хлѣсткіна Е.К., Насырова Ф.Ю. Геномный анализ культурных и дикорастущих форм зерновых злаков в Таджикистане // Материалы 6 съезда физиологов растений РФ. Сыктывкар. 2007. С. 223-225.

10. Сергеев Д.А., Хурматов Х.Х., Гулов М.К., Насырова Ф.Ю. Геномный анализ культивируемых сортов пшеницы, произрастающих в Таджикистане // Материалы конференции, посвященной 100 - летию проф. О.Ш. Шукуров. Душанбе. 2008. С. 20-21.

11. Сергеев Д.А., Хурматов Х.Х., Насырова Ф.Ю. Геномный анализ пшениц, возделываемых в Таджикистане // Материалы научной

конференции, посвящённой памяти академика Академии наук Республики Таджикистан Ю.С. Насырова. Душанбе. 2008. С. 108-109.

Подписано в печать 19.02.2009 г. Формат 60x84 1/16.  
Бумага офсетная. Печать ризография.  
Тираж 100 шт. Объем 1,5 п.л.

**Отпечатано в ООО «Азия-Принт»**