

ГЕНЕТИКА И СЕЛЕКЦИЯ

ПОДБОР КОМБИНАЦИЙ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЖСОРТОВОГО И ВНУТРИСОРТОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА GLYCINE HISPIDA

Е.В. Романова¹, А.А. Кочумова², Е.О. Шмелькова¹

¹Кафедра генетики, растениеводства и защиты растений
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

²Лаборатория генетики растений
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
ул. Губкина, 3, Москва, Россия, 117971

В статье описан опыт подбора комбинаций праймеров для проведения AFLP-анализа внутрисортového и межсортového полиморфизма сортообразцов сои. В ходе опыта было протестировано 18 комбинаций праймеров, в результате отобрано 5 праймерных комбинаций, наиболее информативных для маркирования генома сои. Всего детектировано 132 AFLP-фрагмента, из которых 60 являлись полиморфными и характеризовали индивидуальные генотипы сортов.

Ключевые слова: соя, сорта, внутрисортовой и межсортовой полиморфизм, ДНК, AFLP-анализ, праймеры.

Оценка межсортového и внутрисортového полиморфизма является важной задачей селекционеров. В настоящее время одним из главных методологических подходов в изучении генетического полиморфизма растений является применение молекулярных маркеров [10]. Так, для генотипирования коллекций применяются различные по воспроизводимости, надежности и эффективности маркерные системы — RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), STS (sequence tagged sites), AFLP (amplified fragment length polymorphism) и др., позволяющие определять полиморфизм в различных областях генома [4]. Это — запасные белки, изоферменты и полиморфные фрагменты ДНК [2; 3; 16]. Они в меньшей мере подвержены фенотипической изменчивости и в большинстве случаев имеют кодоминантный тип наследования. На их основе проводится биохимическая паспортизация сортов и гибридов многих сельскохозяйственных культур. Данные биохимической паспортизации можно использовать при регистрации сортов и гибридов, а так же для защиты прав селекционеров [1; 5; 6].

В настоящее время наиболее популярен быстрый и высокопроизводительный метод AFLP-анализа, дающий возможность одновременно анализировать большое число (50—300) полиморфных локусов преимущественно селективно-нейтральной природы, представленных уникальными и умеренно повторяющимися последовательностями [12; 17]. AFLP широко используется для анализа популяционного полиморфизма, филогенетических отношений, идентификации видов, маркирования локусов, сцепленных с хозяйственно ценными признаками [11; 13; 14]. AFLP-подход хорошо зарекомендовал себя при исследованиях генетического полиморфизма у разных объектов, в том числе у культивируемых видов растений [7; 15; 18].

Анализ включает следующие этапы:

- 1) разрезание геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции и сшивание липких концов с двуцепочечными адаптерами с помощью лигазы;
- 2) селективная ПЦР-амплификация набора рестрикционных фрагментов;
- 3) электрофоретический анализ амплифицированных фрагментов [9].

Важной задачей при AFLP-анализе является наиболее оптимальный подбор комбинаций праймеров, который позволит с высокой точностью определить полиморфизм сортов, что и являлось основной целью нашей работы.

Материалы и методы. Материалом для подбора праймеров для AFLP-анализа послужили 15 сортообразцов сои коллекции ВИР, предоставленные лабораторией ВНИИССОК: Соната, Детерминант, Ugra, Алтом, Соер-4, Nordik, Сибниик 215, Сибниисхоз 6, Окская, Гармония, Лидия, Соната 2013 г., Гармония 2013 г., Лидия 2013 г., Соер-4 2013 г.

Работа проводилась в лаборатории генетики растений Учреждения Российской академии наук Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН. Семена вышеперечисленных сортообразцов, предварительно обработанные слабым раствором $KMnO_4$, проращивали в чашках Петри в течение 3—5 суток. Выделение ДНК проводили из индивидуальных проростков стандартным СТАВ-методом с небольшими модификациями [8]. Для выделения растительной ДНК были использованы следующие растворы:

Буфер 1 (экстрагирующий): 0,35 М Сорбит
0,1 М Tris HCl (pH — 7,6)
0,005 М ЭДТА Na_2

Буфер 2 (лизирующий): 0,2 М Tris HClb (pH = 8)
0,05 М ЭДТА Na_2
2 М NaCl
2% СТАВ
Саркозил 5% (Sodium lauroyl sarcosinate)
Бисульфит натрия (Sodium bisulfite solution) 38—40%

В ходе рестрикции 300 нг исходной ДНК было гидролизованно с использованием 5 ед. эндонуклеазы рестрикции EcoRI (NEB) и 5 ед. эндонуклеазы рестрикции MseI (NEB). Общий объем рестрикционной смеси — 40 мкл. Реакция проводилась при 65 °С, 3 часа в приборе Gene Amp PCR system 9700. При лигировании

специфичные синтетические двухцепочные адаптеры для каждого сайта рестрикции сшиваются с полученными фрагментами ДНК. В пробирку с продуктом реакции рестрикции добавили 10 мкл лигирующей смеси, состоящей из буфера для рестрикции, T4 DNA ligase (Invitrogen), 10 mM ATP и по 10 mM каждого из адаптеров. Лигирование проводили в течение 6 часов при 37 °С. Затем лигазу инактивировали в течение часа при 65 °С (в приборе Gene Amp PCR system 9700). Общий объем разбавили в 4 раза, добавив деионизированной воды (150 мкл).

Преселективная полимеразно-цепная реакция (PCR I) выполняется с использованием олигонуклеотидных праймеров, взаимодополняющих адаптер и сайты рестрикции и содержащих по одному селективному нуклеотиду, что позволяет отобрать только определенный набор фрагментов: E01 и M02. К 5 мкл лигирующей смеси добавили 15 мкл смеси, состоящей из 0,5 единиц BioTaqPol полимеразы, $\times 10$ буфера, 25 mM MgCl₂, 2 mM каждого из нуклеотидов и по 10 mM каждого из праймеров, деионизированной воды до общего объема 15 мкл. Температурный профиль: денатурация 5 минут при 95 °С, 12 циклов (94 °С — 30 сек, 65 °С — 30 сек, 72 °С — 1 мин, с каждым циклом уменьшали температуру отжига на 0,7 °С), далее 22 цикла (94 °С — 30 сек, 56 °С — 30 сек, 72 °С — 1 мин) и финальная элонгация 72 °С — 10 мин. ПЦР проводился на амплификаторе Gene Amp PCR system 9700. Продукты амплификации ПЦР I необходимо разделить на 1,2%-агарозном геле, для того, чтобы посмотреть успешно ли прошла ПЦР, а также выровнять концентрации амплификатов.

Следующий этап — селективная амплификация, для которой продукты преселективной амплификации разводят в 2—10 раз и используют в качестве матрицы для второго раунда амплификации. Обычно для второй селективной амплификации к праймерам добавляют два и больше дополнительных нуклеотида, что позволяет осуществить отбор определенного набора фрагментов. Мы использовали 1 праймер EcoRI с тремя селективными нуклеотидами и 1 праймер MseI с четырьмя селективными нуклеотидами. Всего протестировано 23 комбинации праймеров. Все комбинации праймеров представлены в табл. 1.

К 10 мкл амплификата ПЦР I добавили 10 мкл смеси, состоящей из: 10 \times PCR буфера, 2 mM каждого из нуклеотидов, 25 mM MgCl₂, 10 mM праймера MseI и 10 mM праймера EcoRI, 0,5 единиц BioTaqPol полимеразы, деионизированной воды до общего объема 10 мкл. Температурный профиль: денатурация 5 минут при 95 °С, 12 циклов (94 °С — 30 сек, 65 °С — 30 сек, 72 °С — 1 мин, с каждым циклом уменьшали температуру отжига на 0,7 °С), далее 32 цикла (94 °С — 30 сек, 56 °С — 30 сек, 72 °С — 1 мин) и финальная элонгация 72 °С — 10 мин. ПЦР проводился на амплификаторе Gene Amp PCR system 9700. Полученные ДНК-фрагменты разделяли в 6% полиакриламидном геле с проявлением в растворе нитрата серебра.

Растворы для проявления геля:

Staining solution

2,5 г — нитрат серебра

3,5 мл — 37% р-р формальдегида

2,5 л — MQ

Developing solution

75 г — карбоната натрия (безводного)
 3,75 мл — 37% р-р формальдегида
 500 мкл — 1% р-р тиосульфата натрия
 до 2,5 л MQ

После просушивания геля просматривали его на световом столике.

Результаты и обсуждение. Подбор праймерных комбинаций, выявляющих межсортовой и внутрисортовой полиморфизм у *Glycine hispida*.

Продукты амплификации ПЦР I были разделены на агарозном геле, что показало успешное завершение ПЦР, а также позволило выровнять концентрации амплификатов, добавляя разное количество воды. По интенсивности флуоресцирования можно судить о концентрации амплификатов.

Далее на ограниченной выборке образцов (3 сорта) сравнили эффективность 18 комбинаций праймер/фермент. В предварительных тестах использовали два фермента рестрикции, два соответствующих адаптера и 18 праймеров (табл. 1).

Образцы ДНК гидролизировали при помощи двух эндонуклеаз рестрикции — EcoRI (NEB) и MseI (NEB) в 2-кратной повторности. Затем была проведена реакция лигирования с помощью фермента T4 DNA ligase (Invitrogen), в результате которой произошло связывание «липких» концов фрагментов с олигонуклеотидными адаптерами. После лигирования проведены 2 ПЦР. Первая ПЦР — преселективная с использованием олигонуклеотидных праймеров, взаимодополняющих адаптер и сайты рестрикции. К праймерам добавляются нуклеотиды, чтобы отобрать только определенный набор фрагментов. Мы использовали праймеры E01(A-3') и M02(C-3'). Для ПЦР II использовались праймеры с 3-мя или 4-мя селективными нуклеотидами: 1 праймер EcoRI с 3-мя селективными нуклеотидами и 1 праймер MseI с 4-мя селективными нуклеотидами. После разделения фрагментов ДНК в полиакриламидном геле приступили к проявлению результатов. Подсчитывали общее число AFLP-фрагментов в спектрах каждой праймерной комбинации, а также число полиморфных AFLP-фрагментов.

Таблица 1

Адаптеры и праймеры для преамплификации и селективной амплификации, использованные на предварительном этапе тестирования сортообразцов *Glycine hispida*

Адаптер/праймер	Код	Нуклеотидная последовательность
Адаптеры		
EcoRI-адаптер 1		5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'
EcoRI-адаптер 2		5' AAT TGG TAC GCA GTC 3'
MseI-адаптер 1		5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3'
MseI-адаптер 2		5' TAC TCA GGA CTC AT 3'
Праймеры для преамплификации		
EcoRI-праймер + A	E01	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C + A-3'
MseI- праймер + C	M02	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + C-3'
Праймеры для селективной амплификации		
EcoRI-праймер + A + AGC	E40	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C + AGC-3'
EcoRI-праймер + A + ACT	E38	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C + ACT-3'
EcoRI-праймер + A + AAC	E32	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C + AAC-3'
EcoRI-праймер + A + ATG	E45	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C + ATG-3'

Адаптер/праймер	Код	Нуклеотидная последовательность
Msel-праймер + C + CTC	M60	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CTC-3'
Msel-праймер + C + CAT	M50	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CAT-3'
Msel-праймер + C + CGA	M55	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CGA-3'
Msel-праймер + C + CTA	M59	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CTA-3'
Msel-праймер + C + CCC	M52	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CCC-3'
Msel-праймер + C + CTG	M61	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CTG-3'
Msel-праймер + C + CTC + C	M60C	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CTC+C-3'
Msel-праймер + C + CTC + T	M60T	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CTC+T-3'
Msel-праймер + C + CAT + C	M50C	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CAT+C-3'
Msel-праймер + C + CAT + G	M50G	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CAT+G-3'
Msel-праймер + C + CCC + A	M52A	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CCC+A-3'
Msel-праймер + C + CCC + C	M52C	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A + CCC+C-3'

На основе этих данных можно сделать вывод об эффективности праймерных комбинаций. Соответственно, чем большее число фрагментов в спектре дает праймерная пара и чем больше среди них полиморфных фрагментов, тем эффективнее праймерная пара. Ее можно будет использовать для анализа более крупной выборки. Однако для удобства анализа число фрагментов в спектре не должно быть и чрезмерно большим.

Для последующего AFLP-анализа отобрали пять праймерных комбинаций, позволяющих получать высоковоспроизводимые ДНК-спектры и выявлять межсортовой и внутрисортовой полиморфизм.

AFLP-анализ сортообразцов сои. Отобранные пять комбинаций использовали для оценки полиморфизма у 15 сортообразцов сои (табл. 2).

Таблица 2

**Показатели полиморфизма у сортообразцов сои,
полученные с использованием отобранных AFLP-праймеров**

Праймер/фермент (EcoRI/Msel)		Число амплифицированных фрагментов		
комбинация	селективные нуклеотиды	общее	поли- морфных	процент полиморфных фрагментов
E38/M60	EcoRI + A + ACT/Msel +C + CGA	23	12	52
E38/M60C	EcoRI + A + ACT/Msel +C + CGA + C	27	14	52
E32/M61	EcoRI + A + AAC/Msel +C + CTG	15	4	27
E32/M59	EcoRI + A + AAC/Msel +C + CTA	32	14	44
E32/M52A	EcoRI + A + AAC/Msel +C + CCC + A	35	16	46
Всего	—	132	60	45

Среднее число полиморфных фрагментов на праймер — 12. Данные праймерные комбинации оказались наиболее эффективными для изученных коллекционных образцов сои. Эти комбинации можно использовать в дальнейшем при анализе межсортового и внутрисортового полиморфизма сортообразцов *Glucine hispida*.

Выводы. Таким образом, были подобраны комбинации AFLP-праймеров и ферментов, позволяющие получать полиморфные ДНК-спектры для сортообразцов *Glucine hispida*. С помощью предложенных праймерных комбинаций можно дифференцировать генотипы всех 15 изученных сортообразцов. Для каждого сорта

получены специфические спектры фрагментов амплификации. Всего детектировано 132 AFLP-фрагмента, из которых 60 являлись полиморфными и характеризовали индивидуальные генотипы сортов. Среднее число полиморфных фрагментов — 12. Предложенные комбинации праймеров и ферментов могут в дальнейшем использоваться селекционерами для генотипирования коллекции сои, анализа популяционного полиморфизма, филогенетических отношений, идентификации видов, маркирования локусов, сцепленных с хозяйственно ценными признаками.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Гинс М.С. Изменение биохимического состава семян сои сортов Соната и Гармония при различных условиях выращивания / М.С. Гинс, О.А. Селихова, Е.А. Семенова, Л.Е. Иваченко, Е.В. Романова, С.Р.Е. Або Хегани // Доклады РАСХН. 2005. № 5. С. 10—12.
- [2] Иваченко Л.Е. Ферменты как маркеры адаптации сои к условиям выращивания: монография. Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2011.
- [3] Конарев А.В. Адаптивный характер молекулярного полиморфизма и его использование в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 4—11.
- [4] Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1986.
- [5] Рамазанова С.А. Внутрисортной полиморфизм сортов сои селекции ВНИИМК // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2009. № 2.
- [6] Хавкин Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур // Сельскохозяйственная биология. 2003. № 3. С. 28—41.
- [7] Akkale C., Yildirim Z., Yildirim M.B., Kaya C., Ozturk G., Bahattin T. Assessing genetic diversity of some potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes grown in Turkey using the AFLP marker technique // Turkish J. Field Crops, 2010, 15(1): 73—78.
- [8] Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. 1987. Vol. 19. P. 11—15.
- [9] Fry NK1, Savelkoul PH, Visca P. Amplified fragment-length polymorphism analysis // Methods Mol. Biol. 2009. 551:89—104.
- [10] Fridovich I. Superoxide dismutases // Advances in Enzymology. 1986. V. 58. P. 61—97.
- [11] Kim P., Leckman J.F., Mayes L.C., Feldman R., Wang X., Swain J.E. The plasticity of human maternal brain: Longitudinal changes in brain anatomy during the early postpartum period // Behavioral Neuroscience. 2010. 124: 695—700.
- [12] Maughan P.J., Saghai Maroof M.A., Buss G.R., Huestis G.M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis // Theor. Appl. Genet. 1996. 93. P. 392—401.
- [13] Renganayaki K., Read J.C., Fritz A.K. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers // Theor. Appl. Genet. 2001. 102: 1037—1045.
- [14] Soleimani V.D., Baum B.R., Johnson D.A. Identification of Canadian durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf) Husn.) cultivars using AFLP and their STS markers // Can. J. Plant Sci. 2002. 82: 35—41.
- [15] Tumbilen Y., Frary A., Mutlu S., Doganlar S. Genetic diversity in Turkish egg-plant (*Solanum melongena*) varieties as determined by morphological and molecular analyses // Int. Res. J. Biotechnol. 2011. 2(1): 16—25.
- [16] Vallejos C.E. Enzyme activity staining // Ysozymes in plant genetics and breeding. Part A. Amsterdam: Elsevier, 1983. P. 469—515.

- [17] Vos P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // *Nucleic Acids Res.* 1995. 23. P. 4407—4414.
- [18] Wang F., Li F., Wang J., Zhou Y., Sun H. Genetic diversity of the selected 64 potato germplasm revealed by AFLP markers // *Mol. Plant Breed.* 2011. 12(4): 22—29.

SELECTION COMBINATIONS OF PRIMERS FOR DETERMINING INTERVARIETAL AND INTRAVARIETAL POLYMORPHISM GLYCINE HISPIDA

E.V. Romanova¹, A.A. Kochumova², E.O. Shmelkova¹

¹Department of genetic, plant growing and plant protection
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

²Laboratory of Plant Genetics
Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences
Gubkina str., 3, Moscow, Russia, 119333

The article describes the experience of selecting combinations of primers for AFLP-analysis intravarietal and intervariatal polymorphism soybean accessions. During the experiment, has been tested 18 primer combinations. As a result, were selected 5 primer combinations, the most informative labeling for the soybean genome. Total detect 132 AFLP-fragments, of which 60 were polymorphic and characterized by individual genotypes varieties.

Key words: soybean, variety, and intravariety intervariatal polymorphism, DNA, aflp-analysis, primers.

REFERENCES

- [1] Gins M.S. Izmenenie biohimicheskogo sostava semjan soi sortov Sonata i Garmonija pri razlichnyh uslovijah vyrashhivaniya / M.S. Gins, O.A. Selihova, E.A. Semenova, L.E. Ivachenko, E.V. Romanova, S.R.E.Abo Hegani // *Doklady RASHN.* 2005. № 5. S. 10—12.
- [2] Ivachenko L.E. Fermenty kak markery adaptacii soi k uslovijam vyrashhivaniya: monografija. Blagoveshhensk: Izd-vo BGPU, 2011.
- [3] Konarev A.V. Adaptivnyj harakter molekularnogo polimorfizma i ego ispol'zovanie v reshenii problem geneticheskikh resursov rastenij i selekcii // *Agrarnaja Rossija.* 2002. № 3. S. 4—11.
- [4] Levites E.V. Genetika izofermentov rastenij. Novosibirsk: Nauka. Sibirskoe otdelenie, 1986.
- [5] Ramazanova S.A. Vnutrisortovoj polimorfizm sortov soi selekcii VNIIMK / Guchetl' S.Z., Cheljustnikova T.A., Antonova T.S., Moshnenko E.V. // *Maslichnye kul'tury. Nauchno-tehnicheskij bjulleten' Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnyh kul'tur,* 2009. N 2.
- [6] Havkin Je.E. Molekularnaja selekcija rastenij: DNK-tehnologii sozdaniya novyh sortov sel'skohozjajstvennyh kul'tur // *Sel'skohozjajstvennaja biologija.* 2003. № 3. S. 28—41.
- [7] Akkale C., Yildirim Z., Yildirim M.B., Kaya C., Ozturk G., Bahattin T. Assessing genetic diversity of some potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes grown in Turkey using the AFLP marker technique. *Turkish J. Field Crops,* 2010, 15(1): 73—78.

- [8] Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 1987. V. 19. P. 11—15.
- [9] Fry NK1, Savelkoul PH, Visca P. (2009) Amplified fragment-length polymorphism analysis. *Methods Mol. Biol.* 551:89—104.
- [10] Fridovich I. Superoxide dismutases // *Advances in Enzymology*. 1986. V. 58. P. 61—97.
- [11] Kim P., Leckman J.F., Mayes L.C., Feldman R., Wang X., Swain J.E. The plasticity of human maternal brain: Longitudinal changes in brain anatomy during the early postpartum period. *Behavioral Neuroscience*, 2010, 124: 695—700.
- [12] Maughan P.J., Saghai Maroof M.A., Buss G.R., Huestis G.M. (1996) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93, 392—401.
- [13] Renganayaki K., Read J.C., Fritz A.K. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, 102: 1037—1045.
- [14] Soleimani V.D., Baum B.R., Johnson D.A. Identification of Canadian durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf) Husn.) cultivars using AFLP and their STS markers. *Can. J. Plant Sci.*, 2002, 82: 35—41.
- [15] Tumbilen Y., Frary A., Mutlu S., Doganlar S. Genetic diversity in Turkish egg-plant (*Solanum melongena*) varieties as determined by morphological and molecular analyses. *Int. Res. J. Biotechnol.*, 2011, 2(1): 16—25.
- [16] Vallejos C.E. Enzyme activity staining // *Ysozymes in plant genetics and breeding. Part A*. Amsterdam: Elsevier, 1983. R. 469—515.
- [17] Vos P. et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res.* 23, 4407—4414.
- [18] Wang F., Li F., Wang J., Zhou Y., Sun H. Genetic diversity of the selected 64 potato germplasms revealed by AFLP markers. *Mol. Plant Breed.*, 2011, 12(4): 22—29.