

ISSN 1999-9127

Государственное научное учреждение
**«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 26**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2019

УДК [577.21+575] (082)

Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2019. — Т. 26. — 180 с. — ISSN 1999-9127.

В сборнике научных трудов публикуются обзорные и экспериментальные статьи в области молекулярной и прикладной генетики растений, микроорганизмов, животных, человека, отражающие исследования генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется наиболее актуальным проблемам геномики, генетической и клеточной инженерии. Публикуются результаты изучения генетических основ селекции растений, животных и микроорганизмов, разработки эффективных биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, охраны окружающей среды, биобезопасности.

Сборник предназначен для специалистов, работающих в области генетики, преподавателей, аспирантов и студентов ВУЗов биологического, сельскохозяйственного и медицинского профиля.

Редакционная коллегия:

А.В. Кильчевский — главный редактор, Л.В. Хотылёва — зам. главного редактора;
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.П. Ермишин,
А.И. Ковалевич, Ф.И. Привалов, А.В. Сукало, В.А. Лемеш, С.А. Лихачёв,
Н.П. Максимова, С.Б. Мельнов, М.Е. Михайлова, И.Б. Моссэ, М.Е. Никифоров,
В.Е. Падутов, В.Н. Решетников, Е.А. Сычёва, Н.И. Дубовец, В.В. Титок, И.П. Шейко,
О.Н. Харкевич — члены редколлегии;
А.Л. Богданова — ответственный секретарь.

УДК [577.21+575] (082)
ISSN 1999-9127

Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

О.Г. Бабак, Т.В. Никитинская, Н.А. Некрашевич, К.К. Яцевич, А.В. Кильчевский Сравнительный анализ гомологии гена транскрипционного фактора NAC-NOR у томата и перца и изучение его полиморфизма	7
Е.А. Фомина, Т.М. Дмитриева, О.Ю. Урбанович Использование молекулярных маркеров в селекционном процессе озимой пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.) для выделения образцов, перспективных по аллельному составу генов, оказывающих влияние на хлебопекарное качество зерна и высоту растения.....	19
Г.В. Мозгова, Н.Е. Хоружий, А.В. Амосова, Я.Э. Пилюк, В.М. Белявский, С.Ю. Храмченко, О.В. Муравенко, В.А. Лемеш Генетический полиморфизм рапса (<i>Brassica napus</i>) в связи с морозостойкостью	34
П.С. Кирьянов, О.Ю. Баранов, А.А. Маслов, А.В. Падутов Молекулярно-генетические подходы к идентификации межвидовых и внутривидовых гибридов берез Восточно-Европейского региона	45
О.А. Разумова, Л.В. Можаровская, С.В. Пантелеев, О.Ю. Баранов Идентификация и сравнительный анализ генов целлюлозосинтаз сосны обыкновенной	56
Н.В. Воронова, С.С. Левыкина, Ю.В. Бондаренко, Р.С. Шулинский Некодирующие области в митохондриальном геноме тли <i>Aphis fabae mordvilko</i> Börner & Janisch, 1922.....	64
Р.И. Шейко Анализ генетической структуры племенных стад свиней и повышение их продуктивных качеств с использованием ДНК-маркеров	73
В.Н. Кипень, А.О. Рябцева, С.А. Котова, Н.В. Журина, А.И. Ганджа, И.С. Цыбовский Оценка интрогрессии генов свиньи домашней (<i>Sus scrofa domestica</i>) в генофонд дикого кабана (<i>Sus scrofa scrofa</i>) на основе исследования полиморфизма генов <i>MC1R</i> и <i>NR6A1</i>	83
А.Н. Щаюк, Е.П. Михаленко, О.М. Малышева, М.Н. Шепетько, В.Г. Лебецкий, В.И. Литохин, А.В. Кильчевский Определение соматических мутаций у пациентов с немелкоклеточным раком легкого методом секвенирования нового поколения.....	96
О.М. Малышева, Е.П. Михаленко, В.Ф. Аджиева, А.П. Сухарева, М.В. Артюшевская, К.А. Гомолко, А.В. Кильчевский, Г.А. Шишко Полиморфные варианты rs1124, rs4715 и rs2070687 гена <i>SFTPC</i> у недоношенных новорожденных с синдромом дыхательных расстройств.....	106

<i>Е.Г. Требка, А.В. Богачева, Н.Б. Гусина</i> Хромосомные транслокации как причина олигозооспермии тяжелой степени и необструктивной азооспермии у мужчин	115
<i>А.А. Гусина, Н.Б. Гусина, И.В. Наумчик, Н.В. Румянцева, В.Д. Кулак, И.Н. Мотюк, Е.С. Будейко, С.О. Мясников, К.А. Криницкая, А.С. Сталыбко</i> Новые мутации в гене <i>GNPTAB</i> при муколипидозе II альфа/бета у жителей Республики Беларусь	126
<i>К.В. Жур, И.Б. Моссэ, А.В. Кильчевский, Л.В. Кухтинская, И.А. Чарыкова</i> Ассоциация ряда полиморфизмов генов нейромедиаторных систем с психофизио- логическими характеристиками спортсменов	136
<i>Е.П. Михаленко, А.Н. Щаюк, А.В. Кильчевский</i> Сигнальные пути: механизм регуляции пролиферации и выживаемости опухолевых клеток (Обзорная статья)	145
<i>И.С. Гордей, О.М. Люсиков, И.А. Гордей</i> Молекулярно-генетические изменения при полиплоидизации растений (Обзорная статья)	158
Правила для авторов	174

CONTENTS

<i>O.G. Babak, T.V. Nikitinskaya, N.A. Nekrashevich, K.K. Yatsevich, A.V. Kilchevsky</i> Comparative analysis of the gene homology of the NAC-NOR transcription factor in tomato and pepper and its polymorphism study.....	7
<i>A.A. Famina, T.M. Dmitrieva, O.Yu. Urbanovich</i> Use of molecular markers in winter wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) breeding to isolate the samples prospective by their allelic composition of genes that determine the bread-making quality of grain and the height of plants	19
<i>G.V. Mozgova, N.E. Khoruzhy, A.V. Amosova, Ya.E. Pilyuk, V.M. Belyavsky, S.Yu. Khrumchenko, O.V. Muravenko, V.A. Lemeshev</i> Genetic polymorphism of <i>Brassica napus</i> related to cold tolerance.....	34
<i>P.S. Kiryanov, O.Yu. Baranov, A.A. Maslov, A.V. Padutov</i> Molecular-genetic approaches to the identification of inter- and intraspecies birch hybrids of the Eastern European region.....	45
<i>O.A. Razumova, L.V. Mozharovskaya, S.V. Panteleev, O.Yu. Baranov</i> Identification and comparative analysis of the cellulose synthase genes of scots pine	56
<i>N.V. Voronova, S.S. Levykina, Y.V. Bandarenka, R.S. Shulinski</i> Non-coding regions in the mitochondrial genome of aphids <i>Aphis fabae mordvilko</i> Börner & Janisch, 1922.....	64
<i>R.I. Sheiko</i> Analysis of the genetic structure of pig-breeding herds and improving their productive qualities using DNA markers.....	73
<i>V.N. Kipen, A.O. Rabcava, S.A. Kotava, N.V. Zhurina, A.I. Handza, I.S. Tsybovsky</i> Polymorphism analysis of <i>MC1R</i> and <i>NR6A1</i> genes to evaluate the level of introgression of domestic swine (<i>Sus scrofa domestica</i>) genes in wild boar (<i>Sus scrofa scrofa</i>) population	83
<i>A.N. Shchayuk, A.P. Mikhalevskaya, O.M. Malysheva, M.N. Shapetska, V.G. Lyabetsky, V.I. Litokhin, A.V. Kilchevsky</i> Detection of somatic mutations in patients with non-small cell lung cancer by next-generation sequencing.	96
<i>V.M. Malysheva, A.P. Mikhalevskaya, V.F. Ajyieva, A.P. Sukharava, M.V. Artsiusheuskaya, K.A. Gamolka, A.V. Kilchevsky, G.A. Shyshko</i> Polymorphic variants rs1124, rs4715, rs2070687 of the <i>SFTPL</i> gene in preterm newborns with respiratory distress syndrome	106

<i>E.G. Trebka, A.V. Bahachova, N.B. Gusina</i> Chromosomal translocations as the cause of severe oligozoospermia and non-obstructive azoospermia in men.....	115
<i>A.A. Gusina, N.B. Gusina, V.D. Kulak, I.V. Naumchik, N.V. Rummyantseva, I.N. Motyuk, A.S. Budzeika, S.O. Miasnikov, K.A. Krinitskaya, A.S. Stalybko</i> Novel <i>GNPTAB</i> gene mutations in cases of type II mucopolidosis A/B in the citizens of Belarus.....	126
<i>K.V. Zhur, I.B. Mosse, A.V. Kilchevsky, L.V. Kukhtinskaya, I.A. Charykova</i> Associations of polymorphic variants of a number of neurotransmitter system genes with athlete psychophysiological characteristics.....	136
<i>A.P. Mikhalenka, A.N. Shchayuk, A.V. Kilchevsky</i> Signaling pathways: a mechanism for regulating the proliferation and survival of tumor cells (Review Article).....	145
<i>I.S. Gordej, O.M. Lyusikow, I.A. Gordej</i> Molecular-genetic changes resulting from plant polyploidization (Review Article)	158
Instructions to Authors.....	174

О.Г. Бабак, Т.В. Никитинская, Н.А. Некрашевич, К.К. Яцевич, А.В. Кильчевский

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГОМОЛОГИИ ГЕНА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NAC-NOR У ТОМАТА И ПЕРЦА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ПОЛИМОРФИЗМА

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
O.Babak@igc.by

Изучена гомология генов транскрипционного фактора NAC-NOR у *Solanum lycopersicum* и *Capsicum annuum*. На основе сравнительного анализа ДНК маркируемых областей третьего экзона аллелей *nor* и *norc* установлен 72-процентный уровень их сходства. Разработаны праймеры для выявления полиморфизма гена транскрипционного фактора NAC-NOR как внутри вида *C. annuum*, так и в пределах рода *Capsicum*. У *C. annuum* выявлен полиморфизм *norc* аллелей между острыми и сладкими формами. В изучаемой коллекции перца сладкого выявлены два аллеля — *norc 424*, *norc 427*, встречающиеся с одинаковой частотой. У острой формы Халапеньо, наряду с данными аллелями, выявлен аллель *norc 415*. У сорта Созвездие *C. frutescens* выявлен отличный от *C. annuum* аллель — *norc 421*. В результате двухлетнего изучения форм перца острого, различающихся между собой аллелями *norc*, выявлено удлинение периода от всходов до начала созревания у образцов в следующем порядке: *norc 427*, *norc 424*, *norc 415*. Созданы гибриды для передачи полиморфизма аллеля *norc 415* от острых форм к сладким и изучения его фенотипического проявления у перца сладкого.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, ДНК-маркер, NAC-NOR транскрипционный фактор.

Введение

Ген *Nor* кодирует транскрипционный фактор NAC-NOR, который выполняет важную роль регулирования экспрессии генов, контролирующих процессы созревания плодов и биосинтеза каротиноидов растений семейства *Solanaceae*. У томата данный ген расположен на 10-й хромосоме. Мутация *nor*, вызванная короткой делецией (2 п. н.) в данном гене, приводящей к сдвигу рамки считывания и образованию нефункционального белка, индуцирует повреждение в гене *Psy-1*, протеиновым продуктом которого является фитоинсинтаза — фермент, катализирующий синтез фитоина (предшественника ликопина) [1, 2]. Другим значимым воздействием на процесс созревания плодов является совместное действие транскрипционных факторов (ТФ) генов *nor* и *rin* в каскаде управления созреванием путем регуляции экспрессии генов, детерминирующих синтез этилена, причем ТФ гена *nor* имеет более глобальный эффект на этиленовое созревание плодов, чем ТФ гена *rin* [3].

Плоды *Solanum lycopersicum* и *Capsicum annuum* принадлежат к различным классам

по типу созревания — климактерическим и неклимактерическим. Созревание плодов томата напрямую зависит от повышения интенсивности дыхания и концентрации этилена [4, 5], в то время как для начала созревания неклимактерических плодов, в частности плодов перца, гормон этилен не требуется, он необходим для завершения процесса созревания. Это было продемонстрировано в различных исследованиях, включая анализ ингибирования биосинтеза этилена и его восприятия [6], получение трансгенных растений с измененным биосинтезом этилена [7], посредством анализа томата, который нечувствителен к этилену по причине мутации в этилен-связывающем домене NR этиленового рецептора [8]. В связи с этим ряд авторов считали действие ТФ генов *nor* и *rin* на созревание плодов перца незначительным. Однако исследованиями последних лет было доказано, что представители MADS-бокс и NAC-бокс генов играют важную роль в регулировании развития и созревания как климактерических, так и неклимактерических плодов [9–11]. Также существует ряд исследований, доказывающих

зависимость созревания неклиматических плодов от этилена [12, 13]. В связи с вышеизложенными задачами данного исследования являются: сравнительный анализ гомологии гена транскрипционного фактора NAC-NOR у томата и перца, изучение полиморфизма данного гена и его фенотипического проявления у представителей рода *Capsicum* с целью идентификации его аллельного состава и разработки ДНК-маркеров для селекции на качество плодов и сроки их созревания.

Материалы и методы

В качестве исходного материала для анализа маркируемых областей гена транскрипционного фактора NAC-NOR (*norc*) использовали более 30 форм *Capsicum annuum* L., *C. frutescens* коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси и филиала ФГБНУ ФНЦО — Всероссийского научно-исследовательского института селекции и семеноводства овощных культур.

Выделение ДНК проводили при помощи Genomic DNA Purification Kit («Thermo Scientific», США) из проростков перца согласно протоколу. Количество ДНК в образце определяли на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro (Швеция). ДНК-пробу для каждого сорта выделяли и анализировали в трехкратной повторности.

ПЦР-реакцию проводили в термоциклере Biometra T Professional Basic (Германия). Реакционная ПЦР-смесь объемом 15 мкл содержала 60–100 нг геномной ДНК, 2,5 mM dNTP Mix («Thermo Scientific», США), 1,4 единицы Tornado DNA-полимеразы в инкубационном буфере “F” («Праймтех», Республика Беларусь) и 5 pmol/μl олигонуклеотидных праймеров («Праймтех», Республика Беларусь). ПЦР-реакцию проводили в Термоциклере Biometra T Professional Basic (Германия). На первоначальном этапе использовали праймеры, разработанные для идентификации полиморфизма у томата, далее, по результатам секвенирования маркируемой области гена у перца, — со специфическими праймерами, разработанными для идентификации выявленного полиморфизма.

Продукты ПЦР реакции разделяли методом электрофореза в 1,9% агарозном геле в присутствии бромистого этидия и документиро-

вали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000 (США). Размеры амплифицированных фрагментов определяли при использовании в качестве маркера молекулярного веса 100 bp Plus DNA ladder («Thermo Scientific», США).

Для определения нуклеотидных последовательностей гена ТФ NAC-NOR проводили секвенирование амплифицированных продуктов. Для этого фрагменты амплификации разделяли в однопроцентном агарозном геле, затем вырезали и очищали с использованием набора DNA Extraction Kit («Thermo Scientific», США) согласно методике производителя. Секвенирующие реакции выполняли с применением набора Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) согласно методике производителя. Продукты секвенирующей реакции очищали с использованием колонок Centri-Sep™ («Applied Biosystems», США), высушивали в вакууме, растворяли в 20 мкл формамида, денатурировали нагреванием до 95 °C в течение 2 мин и далее проводили капиллярный электрофорез с использованием ДНК-секвенатора ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Компьютерную обработку данных, полученных в результате секвенирования, проводили в программе Sequencing Analysis Software v 5.2 («Applied Biosystems», США). Анализ гомологии нуклеотидных последовательностей участков генов (процент перекрытия и процент сходства последовательностей) проводили с использованием базы данных GenBank при помощи анализатора BLAST Национального центра биотехнологической информации США. Процент перекрытия — это отношение области перекрытия сравниваемых фрагментов при поиске сходства >60% методом Blast-анализа к общей длине сравниваемого участка × 100%; процент сходства — это процент совпадения нуклеотидов в областях перекрытия сравниваемых последовательностей.

Результаты и обсуждение

Основываясь на филогенетической близости представителей семейства *Solanaceae*, проведена апробация ранее разработанных ДНК-маркеров для идентификации аллелей гена ТФ LeNAC-NOR томата (*Nor*; *nor*) на изучаемых коллекциях перца сладкого.

Был установлен 77,7% уровень сходства нуклеотидной последовательности участка ДНК перца размером 169 п. н. (синтезированного с помощью маркера *norF/R*) с соответствующим фрагментом гена *Nor* у томата. Было предположено, что полноразмерный ген *Nor* томата и перца сладкого имеет высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей на всей протяженности. Нуклеотидная последовательность гена *Nor* томата была описана и депонирована в GenBank под номером AY573803. Подобраны пять пар прайме-

ров (табл. 1, рис. 1), последовательно перекрывающих полноразмерную последовательность гена ТФ LeNAC-NOR у томата.

При амплификации с разработанными праймерами на геномной ДНК перца шло образование определенных ПЦР-фрагментов в каждом из описанных случаев. Фрагменты, близкие по размеру к томатным, были вырезаны из геля, очищены и секвенированы. Для установления сходства секвенированных продуктов перца с нуклеотидными последовательностями в базе GenBank был проведен Blast-поиск (табл. 2).

Таблица 1

Праймеры, перекрывающие последовательность гена *Nor* у томата

№ пары	Праймер	Последовательность праймера	Размер синтезируемого фрагмента
1	NACNOR1F1	CTAAATTCCTTCTTGTTTATCATTTTCTCTC	574 п. н.
	NACNOR1F2	TCATTTTCTCTCTTCCCAAAAA	555 п. н.
	NACNOR1R	AGTTGGTCATAGAAACTTTGTGA	
2	NACNOR2F	GACCAACTTATAAAGATTTGAACCTCG	485 п. н.
	NACNOR2R	CGCCCCGTTAGGATATTTTC	
3	NACNOR3F	AGGCAATATTCGGAGAGCAA	573 п. н.
	NACNOR3R	TGTCGAACCTCTTTCGGCTA	
4	NACNOR4F	GCCGAAAGAGGTTCGACATA	541 п. н.
	NACNOR4R	ACATTGAATTTATTCGAGTTTGTG	
5	NACNOR5F	TCGAATAAATTCAATGTTTCATTAGC	573 п. н.
	NACNOR5R1	TGTTGTTGTTGAATCGAAGGA	
	NACNOR5R2	TTTGTTATAAATGTTCTTATTTGTTAATGTG	804 п. н.

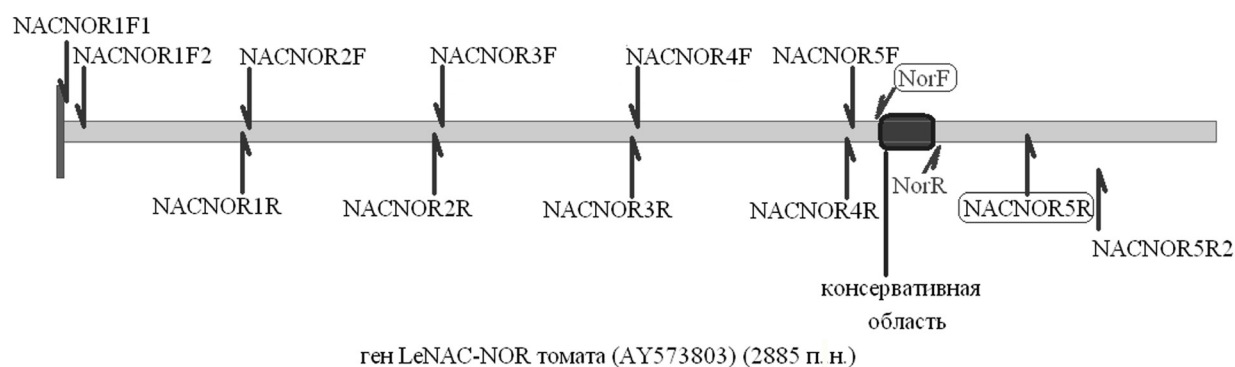


Рис. 1. Схема расположения праймеров на гене *Nor* томата (GenBank AY73803 2885 п. н.)

Таблица 2

Результаты Blast-анализа секвенированных участков ДНК *Capsicum annuum* с праймерами для гена *Nor* томата

Нуклеотидная последовательность (номер доступа)	Процент перекрытия	Процент сходства
ДНК-фрагмент перца размером ≈ 550 п. н., синтезируемого при участии маркера NACNOR1F2/1R:		
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (AY702979)	77%	71%
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (GU048885)	44%	76%
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (JF330775)	64%	70%
ДНК-фрагмент перца размером ≈ 550 п. н., синтезируемого при участии маркера NACNOR2F/2R:		
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (GU048884)	28%	89%
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (JF330777)	29%	86%
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (GU048883)	28%	79%
ДНК-фрагмент перца размером ≈ 1200 п. н., синтезируемого при участии маркера NACNOR3F/3R:		
Хлоропластная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (KR078313)	99%	99%
ДНК-фрагмент перца размером ≈ 600 п. н., синтезируемого при участии маркера NACNOR4F/4R:		
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (GU048886)	96%	87%
ДНК хромосомы 3 <i>Solanum pennellii</i> (HG975442)	97%	83%
ДНК хромосомы 5 <i>Solanum lycopersicum</i> (HG975517)	96%	83%
ДНК-фрагмент перца размером ≈ 650 п. н., синтезируемого при участии маркера NACNOR5F/5R2:		
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (JF330775)	86%	85%
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (GU048890)	97%	71%
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (JF330776)	71%	74%

Однако синтезированные фрагменты не обладали значимым сходством с нуклеотидным составом гена *Nor* томата (*Solanum lycopersicum*) (AY573803). При этом ряд фрагментов имел высокий процент перекрытия и сходства с определенными областями ДНК *C. annuum*.

Большинство фрагментов геномной ДНК, имеющей высокий процент перекрытия и сходства с выделенными нами участками ДНК *C. annuum*, на сегодняшний день не анноти-

рованы. В связи с этим для установления нуклеотидной последовательности гена *Nor* у *C. annuum* на большей протяженности было решено секвенировать фрагменты ДНК перца сладкого, синтезируемые с помощью сочетания томатных праймеров из серий Nor (NorF/ NorR) и NACNOR, фланкирующих область, маркируемую праймерами NorF/NorR (рис. 1): NorF/NACNOR5R, NorF/NACNOR5R2, NACNOR5F/NorR, NACNOR4F/NorR, NACNOR3F/NorR.

С этой целью была проведена градиентная ПЦР с указанными праймерами на геномной ДНК перца с постепенным понижением температуры отжига с 55 °С до 42 °С (рис. 2). При температуре отжига около 45 °С с указанными параметрами праймеров шло образование определенных ПЦР-фрагментов в каждом из описанных случаев. Фрагменты, указанные черными стрелками (рис. 2), были вырезаны из геля, очищены и секвенированы у двух форм перца сладкого Л-160-10 и Игрок. Анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей исследуемых образцов перца выявил их идентичность, кроме участка ДНК размером около 430 п. н., синтезируемого при участии праймеров NorF/NACNOR5R (рис. 2А).

Так, в данном фрагменте у сорта Игрок в отличие от образца Л-160-10 с 297 нуклеотида присутствует делеция в три основания (ACA) (рис. 3).

Для установления сходства полученных секвенированных участков ДНК перца с нуклеотидными последовательностями в базе GenBank был проведен Blast-поиск. Его результаты представлены в табл. 3. Видно, что все установленные нуклеотидные последовательности, кроме фрагмента размером около 430 п. н., не обладали значимым сходством с нуклеотидным составом гена *Nor* томата (*Solanum lycopersicum* — AY573803). Только ДНК-фрагмент перца длиной около 430 п. н., синтезированный с применением праймеров norF и NACNOR5R, обладал 72-процентным уровнем сходства с нуклеотидной последовательностью гена *Nor* томата (AY573803) (рис. 3). После получения данных результатов было предложено назвать ген перца, гомологичный гену *Nor* томата, геном *norc* [14]. Таким образом, скомбинировав праймеры для различных участков гена *Nor* томата из разных

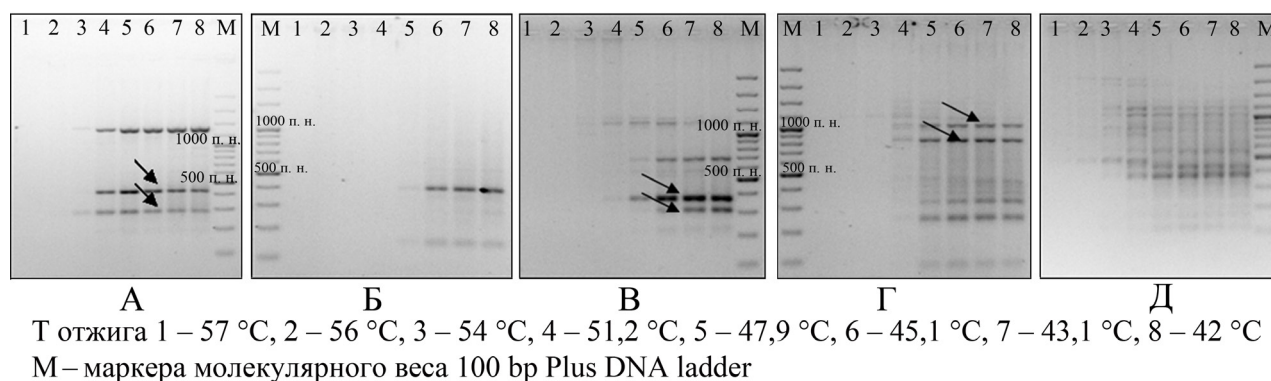


Рис. 2. Электрофорез ПЦР с парами праймеров А — NorF/NACNOR5R, Б — NorF/NACNOR5R2, В — NACNOR5F/NorR, Г — NACNOR4F/NorR, Д — NACNOR3F/NorR на геномной ДНК перца сладкого

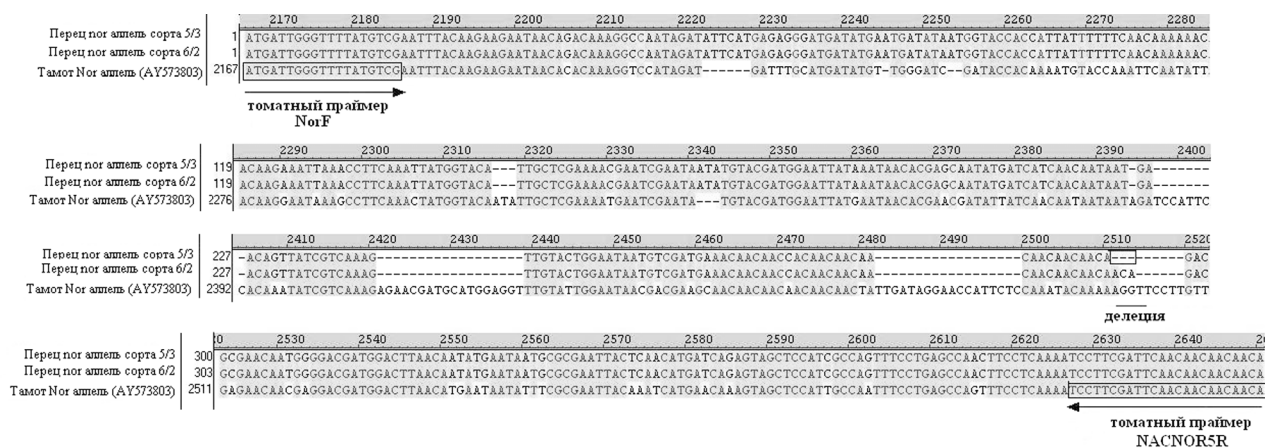


Рис. 3. Вываривание нуклеотидных последовательностей гена *Nor* перца сортов Игрок (5/3) и Л-160-10 (6/2) с соответствующей последовательностью томата

Таблица 3

Результаты Blast-анализа установленных последовательностей ДНК *Capsicum annuum* с праймерами к генам *Nor* и *norc*

Нуклеотидная последовательность (номер доступа)	Процент перекрытия	Процент сходства
ДНК-фрагмент перца размером ≈ 1000 п. н., синтезируемого при участии праймеров NACNOR4F/NorR:		
Теоретически предсказанная не охарактеризованная мРНК перца <i>Capsicum annuum</i> LOC107854041 (XM_016699043)*	93%	76%
ДНК-фрагмент перца размером ≈ 800 п. н., синтезируемого при участии праймеров NACNOR4F/NorR:		
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (GU048883)	92%	79%
ДНК хромосома 9 <i>S. lycopersicum</i> (HG975521)*	94%	83%
ДНК хромосома 8 <i>S. lycopersicum</i> (HG975520)*	89%	83%
ДНК хромосома 11 <i>S. lycopersicum</i> (HG975523)*	85%	83%
ДНК-фрагмент перца размером ≈ 400 п. н., синтезируемого при участии праймеров NACNOR5F/NorR:		
Теоретически предсказанная не охарактеризованная ncRNA перца <i>Capsicum annuum</i> LOC107860985 (XR_001671692)	81%	76%
ДНК-фрагмент перца размером ≈ 300 п. н., синтезируемого при участии праймеров NACNOR5F/NorR:		
Геномная ДНК перца <i>Capsicum annuum</i> (JF330777)	43%	81%
ДНК-фрагмент перца размером ≈ 300 п. н., синтезируемого при участии праймеров NorF/NACNOR5R:		
Теоретически предсказанная не охарактеризованная miscRNA перца <i>Capsicum annuum</i> LOC107877263 (XR_001676311)	83%	74%
ДНК-фрагмент перца сорта Игрок размером 427 п. н., синтезируемого при участии праймеров NorF/NACNOR5R:		
Теоретически предсказанная мРНК транскрипционного фактора NAC перца <i>Capsicum annuum</i> LOC107845296, транскрипционный вариант X2 (XM_016689532)	100%	99%
Теоретически предсказанная мРНК транскрипционного фактора NAC перца <i>Capsicum annuum</i> LOC107845296, транскрипционный вариант X1 (XM_016689531)	100%	99%
Теоретически предсказанная мРНК транскрипционного фактора NAC картофеля <i>S. tuberosum</i> LOC102593641, (XM_006362885)	100%	73%
Ген <i>nor</i> томата <i>S. lycopersicum</i> (AY573803)	100%	72%
Теоретически предсказанная мРНК транскрипционного фактора NAC томата <i>S. pennellii</i> LOC107032538, (XM_015234146)	100%	72%
ДНК фрагмент перца сорта Л-160-10 размером 430 п. н., синтезируемого при участии праймеров NorF/NACNOR5R:		
Теоретически предсказанная мРНК транскрипционного фактора NAC перца <i>Capsicum annuum</i> LOC107845296, транскрипционный вариант X2 (XM_016689532)	100%	100%
Теоретически предсказанная мРНК транскрипционного фактора NAC перца <i>Capsicum annuum</i> LOC107845296, транскрипционный вариант X1 (XM_016689531)	100%	100%
Теоретически предсказанная мРНК транскрипционного фактора NAC картофеля <i>S. tuberosum</i> LOC102593641, (XM_006362885)	100%	73%

Продолжение табл. 3

Нуклеотидная последовательность (номер доступа)	Процент перекрытия	Процент сходства
Ген <i>nor</i> томата <i>S. lycopersicum</i> (AY573803)	100%	72%
Теоретически предсказанная мРНК транскрипционного фактора NAC томата <i>S. pennellii</i> LOC107032538, (XM_015234146)	100%	72%

Примечание. * — неаннотированные последовательности ДНК или функции кодируемых белков пока неизвестны

серий, удалось установить нуклеотидный состав консервативного домена гена *norc* на протяжении 430 п. н. Также был обнаружен полиморфизм в гене *norc* у сорта Игрок — делеция в три основания (ACA), которая приводит к выпадению одной аминокислоты (триптофан) из соответствующего белка.

В табл. 3 также представлены результаты сравнения полученных фрагментов с теоретически предсказанными мРНК транскрипционного фактора NAC у ряда представителей семейства *Solanaceae*. Следует отметить, что полная аннотация десятой хромосомы перца (NC_029986.1), на которой локализован ген-гомолог транскрипционного фактора томата LeNAC-NOR (транскрипционный фактор NAC 56 *C. annuum* (XM_016689531, XM_016689532), появилась в базе данных GenBank 05.05.2016 г. после того, как нами была проведена описанная выше работа. Теоретически предсказанные мРНК транскрипционного фактора NAC перца *C. annuum* (XM_016689532, XM_016689531) представляют собой варианты альтернативного сплайсинга при созревании мРНК после транскрипции

с одного и того же участка гена (рис. 4). Полученные сведения о нуклеотидном составе консервативного домена гена *Nor* у перца полностью согласуются с этими данными. Секвенированный участок входит в состав 3 экзона гена транскрипционного фактора NAC 56.

В базе данных GenBank, помимо геномной ДНК полноразмерного гена NAC-NOR томата *S. lycopersicum* (AY573803), депонирована и соответствующая ему мРНК (AY573802). Парное сравнение нуклеотидных последовательностей мРНК томата и перца показывает уровень сходства между ними около 80%.

Установив пару праймеров, которая четко амплифицирует фрагмент в консервативной области *norc* гена, и, учитывая, что полиморфизм в данной области у томата приводит к нарушению процесса созревания плодов, было проведено типирование коллекции с используемой парой праймеров (NorF/NACNOR5R). ДНК-скрининг разнообразного материала рода *Capsicum* (31 образец) с данной парой праймеров позволил выявить 4 различных фрагмента размерами 415, 421, 424, 427 пар оснований (рис. 5, табл. 4).



Рис. 4. Структура гена транскрипционного фактора NAC 56 у *C. annuum* (база данных GenBank [15])

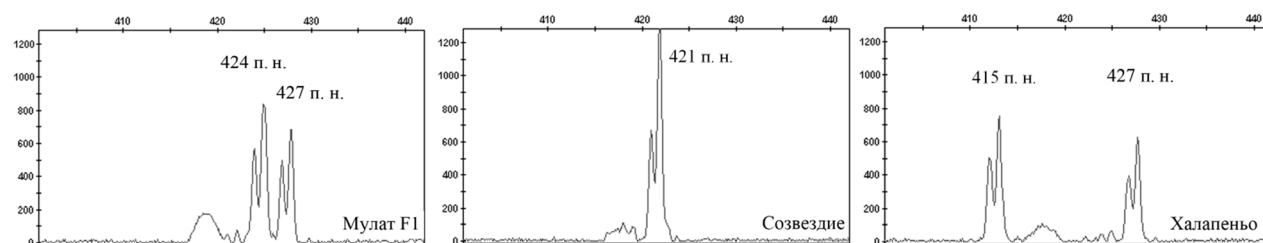


Рис. 5. Результаты фрагментного анализа образцов перца с применением праймеров NorF/NACNOR5R

Таблица 4

Результаты ДНК-типирования образцов рода *Capsicum* с NorF/NACNOR5R праймерами

№ п/п	Образец	Аллель	№ п/п	Образец	Аллель
1	Оранжевое наслаждение	427	17	Солнышко	427
2	Игрок	424	18	Jmins	424
3	Л 160-10	427	19	Pramidal	424, 427
4	Л 45-11	427	20	Zümrüd	424
5	Мулат F ₁	424, 427	21	Л236/09	424
6	Желтоплодный	427	22	Сладкий шоколад	427
7	Златодор	424	23	Исимо	427
8	Сиреневый	424	24	Желтый букет	424
9	Шоколадная красавица	427	25	Отелло	427
10	Фиолетовый красавец	424	26	Белоснежка	427
11	Л-24	424, 427	27	Черный красавец	427
12	Оранжевое чудо	424, 427	28	Чырвоны магнат	424
13	ZongKao	424	29	Халапеньо	415, 424, 427
14	Немезис	427	30	<i>C. frutescens</i> Рябинушка	424
15	Ами	424	31	<i>C. frutescens</i> Созвездие	421

У форм перца сладкого выявлены фрагменты размером 424 и 427 п. н. У перца острого (*C. annuum* var. *longum*), наряду с данными фрагментами, выявлен ампликон размером 415 п. н. У вида *C. frutescens* выявлен отличный от *C. annuum* полиморфизм данного фрагмента гена *norc* — 421 п. н.

Выполнен сравнительный анализ четырех секвенированных ампликонов путем выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *norc* сортов Л-160-10, Игрок, Халапеньо и *C. frutescens* с соответствующими последовательностями теоретически предсказанных мРНК из базы данных GenBank (рис. 6). Выравнивание полученных сиквенсов на последовательности мРНК *C. annuum* базы данных GenBank позволило выявить следующий полиморфизм:

- ампликон размером 427 п. н., синтезированный у образца Л-160-10 и других форм *C. annuum*, характеризовался наличием трех

SNP по сравнению с мРНК *C. annuum* базы данных GenBank;

- ампликон размером 424 п. н., синтезированный у сорта Игрок и других форм *C. annuum*, характеризовался наличием делеции размером 3 п. н. (ACA) по сравнению с фрагментом 427 п. н., которая приводит к выпадению одной аминокислоты (триптофан);

- ампликон размером 421 п. н., синтезированный у сорта Созвездие (*C. frutescens*), содержит 2 SNP и делецию в шесть оснований (ACAACA), приводящую к выпадению двух триптофановых аминокислотных остатков;

- ампликон размером 415 п. н., выявленный только у сорта Халапеньо перца острого, содержит 3 SNP, 2 делеции: одна — аналогичная *C. frutescens*, вторая — в 9 п. н. на расстоянии в 11 п. н. от первой, вызывает сдвиг рамки считывания, приводящий к невозможности трансляции нормального белка.

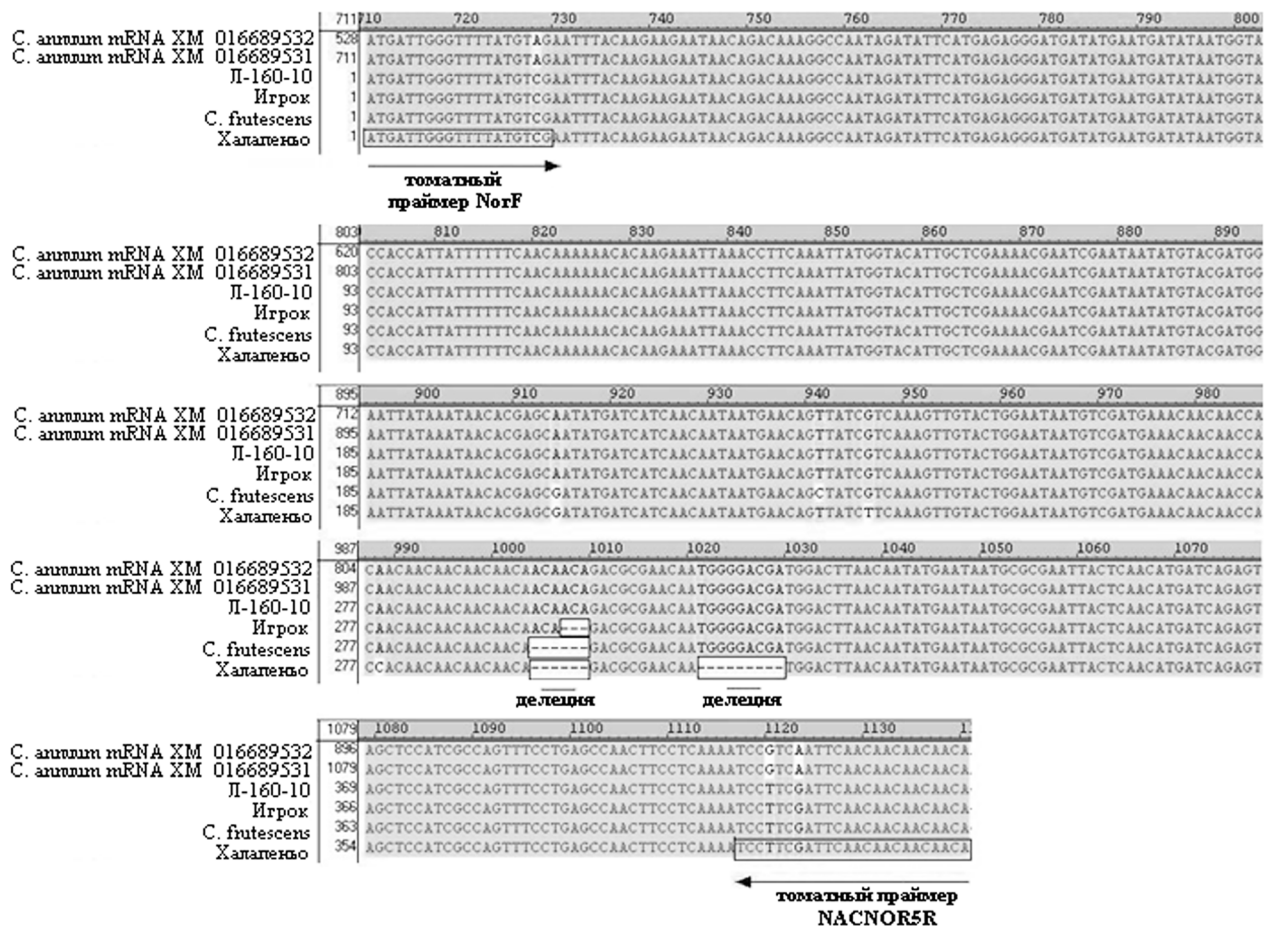


Рис. 6. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *norc* сортов перца с соответствующими последовательностями мРНК из базы данных GenBank

Для изучения фенотипического проявления выявленного полиморфизма из гетерозиготных форм методом ДНК-типирования в следующем поколении отобраны линии, отличающиеся между собой лишь полиморфизмом по данному аллелю. У перца сладкого были отобраны формы с *norc 424* и *norc 427*, у перца острого — *norc 415*, *norc 424* и *norc 427*. Проведено изучение проявления фенотипических признаков (особенности протекания фенологических фаз растений и созревания плодов) в зависимости от выявленного генетического полиморфизма аллеля *norc* (рис. 7). Анализ четырех семей перца сладкого не выявил достоверных отличий между *norc 424* и *norc 427* формами. Из формы острого перца Халапеньо (*C. annuum* var. *longum*) отобраны гомозиготные растения по аллелям *norc 415*, *norc 424* и *norc 427*. Проведено двулетнее изучение (2017–2018 гг.) особенностей протекания фаз развития растений и созревания плодов

в зависимости от выявленного генетического полиморфизма аллелей гена *norc* (рис. 7, 8).

В целом было выявлено удлинение фаз развития растений и срока созревания у формы *norc 415*. Установлено, что гомозиготные растения с аллелем *norc 415* имели более длительный срок созревания плодов в среднем на 8 дней по отношению к растениям с гомозиготным аллелем *norc 424* и на 15 дней по отношению к растениям с гомозиготой *norc 427*.

В дальнейших исследованиях представляет интерес введение аллеля *norc 415*, характерного для острого перца, в формы сладкого перца и изучение его фенотипического проявления на них. Возможно, действие аллеля *norc 415* будет более выраженным, так как формы сладкого перца имеют более крупные, толстостенные плоды. Для этого выполнена гибридизация между различными формами сладкого перца и сортом Халапеньо, выращенные гибриды F_1 и полученные их семена. В 2019

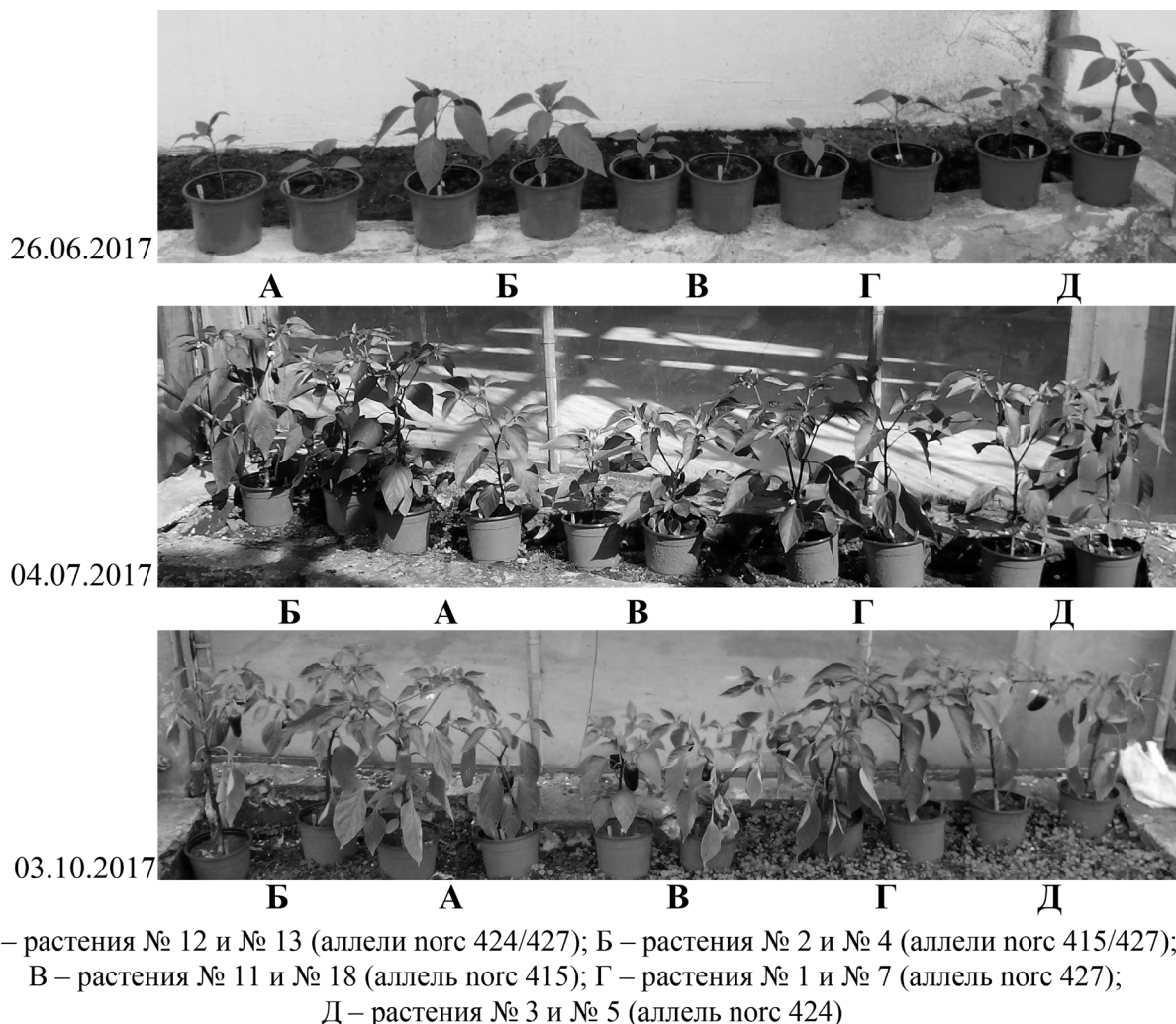


Рис. 7. Развитие растений перца формы Халапеньо с различными аллелями *porc* на различных этапах вегетационного периода



Рис. 8. Степень развития плодов перца формы Халапеньо с различными аллелями *porc* 17.09.2018 года (А – аллелем *porc* 415, Б – *porc* 424, В – *porc* 427)

году планируется получение сладких форм перца с аллелем *porc* 415 с использованием разработанных маркеров к гену *porc*, а также маркеров к аллелю гена *Pun1* [16], определяющему накопление капсаицина и острый вкус плодов *S. annuum*.

Заключение

Выполнены исследования по изучению гомологии генов транскрипционного фактора LeNAC-NOR у томата и перца, расположенного на 10 хромосоме. На основе сравнительного анализа маркируемых областей третьего экзо-

на размером 430 п. н. аллелей *nor* и *norc* установлен 72-процентный уровень их сходства.

Пара праймеров NorF и NACNOR5R позволяет выявлять как внутривидовой полиморфизм гена *NOR* у *C. annuum*, так и в пределах рода *Capsicum*. У *C. annuum* выявлен полиморфизм *norc* аллелей между острыми и сладкими формами. В изучаемой коллекции перца сладкого выявлены два аллеля — *norc 424* и *norc 427*, встречающиеся с одинаковой частотой. У острой формы Халапеньо, наряду с данными аллелями, выявлен аллель *norc 415*. У сорта Созвездие *C. frutescens* выявлен отличный от *C. annuum* аллель — *norc 421*.

В результате двухлетнего изучения трех форм острого перца, полученных методом ДНК-тирования образцов формы Халапеньо, различающихся между собой аллелями *norc*, выявлены отличия по срокам прохождения фаз развития растений. Период от всходов до начала созревания увеличивался у форм в следующем порядке: *norc 427*, *norc 424*, *norc 415* соответственно с разницей между образцами 7–8 дней.

Созданы гибриды для передачи полиморфизма аллеля *norc* от острых форм к сладким и изучения его фенотипического проявления у перца сладкого.

Список использованных источников

1. Fraser, P.D. Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development / P.D. Fraser // *Plant Physiology*. — 1994. — Vol. 105. — P. 405–413.
2. Fray, R., Grierson, D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression / R. Fray, D. Grierson // *Plant Mol. Biol.* — 1993. — V. 22. — P. 589–602.
3. Osorio, S. Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions / S. Osorio // *Plant Physiology*. — 2011. — Vol. 157. — P. 405–425.
4. Lelievre, J.M. Ethylene and fruit ripening / J.M. Lelievre, A. Latche, B. Jones, M. Bouzayen, J.C. Pech // *Physiologia Plantarum*. — 1997. — Vol. 101. — P. 727–739.
5. Barry, C.S. Ethylene and Fruit Ripening / C.S. Barry, J.J. Giovannoni // *Journal Plant Growth Regul.* — 2007. — Vol. 26. — P. 143–159.
6. Yen, H. The tomato *Never-ripe* locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homologue of the Arabidopsis *ETR1* gene / H. Yen, S. Lee, S. Tanksley, M. Lanahan, H.J. Klee, J.J. Giovannoni // *Plant Physiology*. — 1995. — Vol. 107. — P. 1343–1353.
7. Picton, S. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene / S. Picton, S.L. Barton, M. Bouzayen, A.J. Hamilton, D. Grierson // *The Plant Journal*. — 1993. — Vol. 3. — P. 469–481.
8. Lanahan, M.B. The Never Ripe mutation blocks ethylene perception in tomato / M.B. Lanahan, H.C. Yen, J.J. Giovannoni, H.J. Klee // *The Plant Cell*. — 1994. — Vol. 6. — P. 521–530.
9. Vrebalov, J. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato Ripening-inhibitor (*Rin*) locus / J. Vrebalov, D. Ruezinsky, V. Padmanabhan, R. White, D. Medrano, R. Drake, W. Schuch, J. Giovannoni // *Science*. — 2002. — Vol. 296. — P. 343–345.
10. Giovannoni, J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening / J.J. Giovannoni // *The Plant Cell*. — 2004. — Vol. 16. — P. 170–180.
11. Itkin, M. TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network / M. Itkin, H. Seybold, D. Breitel, I. Rogachev, S. Meir, A. Aharoni // *The Plant Journal*. — 2009. — Vol. 60. — P. 1081–1095.
12. Li, L. The regulation mode of *RIN* transcription factor involved in ethylene biosynthesis in tomato fruit / L. Li, B. Zhu, P. Yang, D. Fu, Y. Zhu, Y. Luo // *J. Sci Food Agric.* — 2011. — Vol. 91. — P. 1822–1828.
13. Fujisawa, M. Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator *RIN* by chromatin immunoprecipitation / M. Fujisawa, T. Nakano, Y. Ito // *BMC Plant Biology*. — 2011. — Vol. 11, № 26. — P. 1–16.
14. Babak, O.G. Development of DNA-markers to fruit quality genes of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) / O.G. Babak, T.V. Nikitinskaya, K.K. Yatsевич, N.A. Nekrashevich, A.V. Kilchevsky // XVIth EUCARPIA Capsicum and Eggplant Working Group Meeting. Kecskemét, Hungary, 12–14 September 2016. — P. 137–144.
15. GenBank NCBI [Electronic resource]. —

Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/107845296>. — Date of access: 27.11.2018.

16. Wyatt, L.E. Development and application of a suite of non-pungency markers for the

Pun1 gene in pepper (*Capsicum* spp.) / L.E. Wyatt, N.T. Eannetta, G.M. Stellari, M. Mazourek // Molecular Breeding. — 2012. — Vol. 30, № 3. — P. 1525–1529.

O.G. Babak, T.V. Nikitinskaya, N.A. Nekrashevich, K.K. Yatsevich, A.V. Kilchevsky

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE GENE HOMOLOGY OF THE NAC-NOR TRANSCRIPTION FACTOR IN TOMATO AND PEPPER AND ITS POLYMORPHISM STUDY

Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

Genes' homology of the NAC-NOR transcription factor was studied in *Solanum lycopersicum* and *Capsicum annuum*. Based on a comparative analysis of DNA marked regions of the 3rd exon of *nor* and *norc* alleles, their 72.0% similarity level was established. Primers were developed to identify gene polymorphism of the NAC-NOR transcription factor both within the *C. annuum* species and the *Capsicum* genus. In *C. annuum*, the *norc* allele polymorphism between hot and sweet forms was detected. In the studied sweet pepper collection, two occurring with the same frequency alleles were found — *norc 424* and *norc 427*. Alongside those alleles, the *norc 415* allele was identified in the hot form Jalapeño. In the *C. frutescens* variety (Sozvezdiye), the *norc 421* allele was identified, which is different from *C. annuum*. After a two-year study of hot pepper forms differing from each other in *norc* alleles, the extended period from sprouting prior to the onset of maturation was found in the samples in the order as follows: *norc 427*, *norc 424*, *norc 415*. Hybrids were developed to transfer the *norc415* allele from hot to sweet forms and to study its phenotypic manifestation in sweet pepper.

Key words: *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, DNA-marker, NAC-NOR transcription factor.

Дата поступления статьи: 14 января 2019 г.

Е.А. Фомина, Т.М. Дмитриева, О.Ю. Урбанович

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ОБРАЗЦОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПО АЛЛЕЛЬНОМУ СОСТАВУ ГЕНОВ, ОКАЗЫВАЮЩИХ ВЛИЯНИЕ НА ХЛЕБОПЕКАРНОЕ КАЧЕСТВО ЗЕРНА И ВЫСОТУ РАСТЕНИЯ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: e.fomina@igc.by

Исследован аллельный состав генов, влияющих на качество зерна (*Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1*, а также *Pina-D1* и *Pinb-D1*) и высоту растения (*Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8*) в коллекции из 79 коллекционных и 70 селекционных образцов озимой пшеницы. Было выявлено 43 коллекционных и 5 селекционных образцов, обладающих высокими хлебопекарными качествами зерна (индекс качества 9–10) и одновременно несущих в своих геномах аллели *Rht-B1b*, *Rht-D1b* и *Rht8c* генов короткостебельности, приводящие к снижению высоты растения. Все исследованные образцы являются твердозерными и несут в своих геномах различные мутации в гене *Pinb-D1*.

Ключевые слова: озимая пшеница, твердозерность, глютенины, короткостебельность, хлебопекарное качество зерна.

Введение

Озимая мягкая пшеница — одна из важнейших зерновых культур в Республике Беларусь. По данным Национального статистического комитета под посевные площади пшеницы в 2017 г. было отведено 721 тыс. га, что составляет 29,7% от всех площадей, занятых под зерновые и зернобобовые, и 12,4% от всех посевных площадей в стране [1]. Важная роль в обеспечении нашей республики собственным зерном пшеницы принадлежит сортам отечественной селекции. Так, из 73 сортов озимой пшеницы, занесенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь, к ним относятся 29 (Капылянка, Гармония, Каравай, Былина, Легенда, Саната, Гродненская 7, Спектр, Веда, Узлёт, Зарица, Сюита, Канвеер, Уздым, Ядвіся, Ода, Элегия, Кредо, Сакрэт, Капэла, Августина, Гроднинчанка 5, Балада, Мроя, Набат, Гирлянда, Этюд, Амелия и Раница). В настоящее время ведется планомерная работа по созданию новых короткостебельных сортов озимой пшеницы с высоким потенциалом урожайности и хорошими хлебопекарными качествами, адапти-

рованных к почвенно-климатическим условиям Республики Беларусь. Для решения этой задачи целесообразно использовать молекулярные методы идентификации генов, влияющих на хозяйственно-ценные признаки. Они позволяют повысить точность селекционного отбора и способствуют обогащению генофонда пшеницы генами, широко и успешно используемыми как в отечественной, так и в мировой селекции.

Выбор сортов пшеницы для получения тех или иных продуктов питания зависит от текстуры зерна, а точнее — его эндосперма, т. е. твердозерности. Твердозерные сорта предпочтительны для выпечки дрожжевого хлеба, а мягкозерные — для бездрожжевого хлеба и кондитерских изделий (сухого печенья, кексов, тортов и др.) [2]. Главный ген, отвечающий за текстуру зерна, *Ha*, расположен на коротком плече хромосомы 5D. На гомеологичных хромосомах 5A и 5B гены твердозерности делетированы. Виды пшеницы, у которых D-геном отсутствует (например, *Triticum durum* Desf.), имеют более твердую текстуру зерна по сравнению с твердозерными гексаплоидными сортами [3]. Продуктом гена *Ha* является 15-кДа

белок фриабилин, присутствующий в большом количестве на поверхности крахмала из мягкозерных сортов и линий и в значительно меньшем количестве на поверхности крахмала из твердозерных сортов и линий. В состав фриабилина входят два белка — пуриноиндолин А и пуриноиндолин В, первичная структура которых кодируется генами *Pina-D1* и *Pinb-D1* соответственно. Изменения в аминокислотном составе данных белков напрямую связаны с изменениями в текстуре зерна. Мягкозерные сорта пшеницы содержат одновременно функциональные или «дикие» аллели генов *Pina-D1* (аллель *Pina-D1a*) и *Pinb-D1* (аллель *Pinb-D1a*), в то время как твердозерные сорта пшеницы содержат либо делецию гена *Pina-D1*, либо одну из «мутантных» форм гена *Pinb-D1* (аллели *Pinb-D1a-g* или *Pinb-D1l*) [3–5]. Информация об аллельном составе генов пуриноиндолинов *Pina-D1* и *Pinb-D1*, их фенотипическом проявлении и изменении в первичной структуре пуриноиндолинов приведена в работе Morris et al. [6].

Также значительный вклад в качество хлеба вносят гидрофобные белки глютенины, структура которых кодируется генами, расположенными на длинном плече хромосом первой гомеологической группы А, В и D геномов. Состав глютенинов влияет на эластичность и вязкость теста, из которого выпекают мучные изделия. Основываясь на подвижности субъединиц глютенинов в полиакриламидном геле при проведении электрофореза, их разделяют на 2 типа — высокомолекулярные и низкомолекулярные [4, 7].

Структура глютенинов кодируется полиморфными генами *Glu-1* локусов. В локусах *Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1* расположены два близко сцепленных гена: х- и у-типа. Ген х-типа определяет структуру высокомолекулярных субъединиц с большей молекулярной массой, а ген у-типа — с меньшей. У гексаплоидной пшеницы гены у-типа в геноме А обычно не экспрессируются [4, 8]. На качество муки, производимой из того или иного сорта пшеницы, оказывает влияние разнообразие аллелей, определяющих аминокислотный состав больших субъединиц. Для идентификации этих аллелей предложен целый ряд молекулярных маркеров, которые можно успешно использовать в практических целях.

Гены короткостебельности, называемые *Rht*, успешно используются в селекционном процессе для снижения высоты растения с целью предотвращения полегания. В настоящее время описано более 21 гена короткостебельности [9, 10]. Гены, определяющие высоту растений, можно разделить на две группы в зависимости от их реакции на экзогенную гибберелиновую кислоту (ГК). Нечувствительные к ГК гены короткостебельности располагаются на коротких плечах хромосом 4В и 4D, а гены, чувствительные к ГК, — на хромосомах 2А, 2DS, 7BS и 5А. Молекулярные маркеры, которые идентифицируют эти гены, позволяют успешно вести отбор на короткостебельность.

Целью данной работы является идентификация аллельного состава генов, оказывающих влияние на твердозерность, запасных белков семян глютенинов и короткостебельности в сортах и линиях, используемых в селекционном процессе озимой пшеницы в Республике Беларусь, и выделение среди них образцов, несущих в своих генотипах фаворитные аллели указанных генов.

Материалы и методы

Объектом исследования служила коллекция, состоящая из 79 сортов и 70 линий озимой пшеницы, предоставленных лабораторией озимой пшеницы РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино).

ДНК из зерен выделяли по методу, предложенному Plaschke et al. [11]. Выделение проводили из двух зерновок для каждого сорта.

Анализ аллельного состава генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* проводили согласно методике, предложенной Giroux, Morris et al. [12].

Анализ аллельного состава генов *Glu-A1x*, *Glu-D1x* и *Glu-D1y* проводился согласно методике, предложенной Liu et al. [13]. Для выявления генов, кодирующих субъединицы *Ax1* и *Axnull*, была использована методика, предложенная Laflandra et al. [14]. Выявление генов, кодирующих субъединицу *Bx6*, было проведено по методике, предложенной Schwarz et al. [15], субъединицы *Bx7*, *Bx7** и *Bx17* — Ma et al. [8], субъединицу *Bx7OE* — Ragupathy et al. [16]. Анализ аллельного состава гена *Glu-B1y* проводился согласно Lei et al. [17]. Суммарный индекс хлебопекарного качества вычисляли согласно Payne et al., 1987; Rogers et al., 1989 [18, 19].

Для анализа аллельного состава генов *Rht-B1* и *Rht-D1* использовали методику Ellis с соавт. [20], гена *Rht8* — методику Korzun [21].

Состав реакционной смеси для амплификации объемом 12,5 мкл был следующий: 1×буфер для *Taq* полимеразы «А» без $MgCl_2$, 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ НТФ, 0,25 нМ праймеры, 0,5 ЕА *Taq*-полимераза, 50 нг ДНК. Для анализа использовались праймеры и ПЦР реактивы производства компании «Праймтех» (Республика Беларусь).

Визуализацию фрагментов амплификации проводили после разделения методом электрофореза в трис-ацетатном буфере при помощи системы документирования гелей GelDoc 2000.

Результаты и обсуждение

Анализу подвергались 79 коллекционных и 70 селекционных образцов озимой пшеницы селекции Беларуси, России, Украины, Румынии, Германии, Австрии, Франции и Канады, представляющие интерес для селекционного процесса.

Для идентификации аллелей гена *Pina-D1* были использованы праймеры *PinaD_F* и *PinaD_R*. Образцы, содержащие в своем геноме аллель *Pina-D1a*, образуют в результате ПЦР с данными праймерами фрагмент размером 350 п. н. Образцы, в геноме которых присутствует аллель *Pina-D1b*, продукта ПЦР не образуют [22]. Проведенный анализ показал, что все образцы озимой пшеницы, подвергшиеся тестированию, образовали с данными праймерами ПЦР-продукт размером 350 п. н., и, следовательно, несут в своих геномах аллель *Pina-D1a*.

Для анализа аллельного состава гена *Pinb-D1* были использованы праймеры *PinbD_F* и *PinbD_R*. Продукты амплификации образцов пшеницы с данными праймерами были обработаны рестриктазой *PvuII*, специфичной для выявления мутантного аллеля *Pinb-D1c*. Рестриктаза *PvuII* разрезает ПЦР-продукты амплифицированных образцов, не несущих мутантный аллель *Pinb-D1c*, на фрагменты длиной 264 и 184 п. н. ПЦР-продукты образцов, соответствующих данному мутантному аллелю, не подвергаются расщеплению этой рестриктазой и имеют длину 448 п. н. [23]. Образцы, не несущие мутантный аллель *Pinb-D1c*, для проверки их принадлежности к твердозерным

или мягкозерным сортам, были подвергнуты обработке рестриктазами, специфичными к другим формам мутантных аллелей: *MbiI* (для выявления мутантного аллеля *Pinb-D1b*), *MvaI* (для выявления мутантного аллеля *Pinb-D1e*), *MnII+StyI* (для выявления мутантного аллеля *Pinb-D1d*) и *HphI* (для выявления мутантного аллеля *Pinb-D1f*).

В результате было обнаружено, что в геноме образцов озимой пшеницы присутствуют различные мутантные аллели. 71 коллекционный образец (89,9%) несет *Pinb-D1b* аллель, 3 (3,8%) — *Pinb-D1c* аллель и 5 (6,3%) — *Pinb-D1d* аллель; 41 селекционный образец (58,5%) несет *Pinb-D1b* аллель, 2 (2,9%) — одновременно *Pinb-D1b* и *Pinb-D1d* аллели, 1 (1,4%) — одновременно *Pinb-D1b* и *Pinb-D1f* аллели, 2 (2,9%) — *Pinb-D1c* аллель, 2 (2,9%) — *Pinb-D1d* аллель, 1 (1,4%) — одновременно *Pinb-D1d* и *Pinb-D1f* аллели и 21 (30,0%) — *Pinb-D1f* аллель (табл. 1, 2). Согласно литературным данным в современных сортах в разных странах наиболее распространенными аллельными формами гена *Pinb-D1* являются аллели *Pinb-D1b* и *Pinb-D1c* [4, 22, 23]. Аллель *Pinb-D1b* широко представлен и в образцах исследуемой коллекции, в то время как аллель *Pinb-D1c* уступает по частоте встречаемости ряду других аллелей. В целом результаты исследования показали, что все сорта и линии озимой пшеницы, включенные в коллекцию, являются твердозерными и пригодны для выпечки дрожжевого хлеба.

Молекулярные маркеры были использованы также для определения аллелей генов, кодирующих запасные белки семян глютенины. Среди исследованных коллекционных образцов выявлено 29 различных генотипов (табл. 3). Самыми распространенными являлись генотипы *Glu-A1a*, *Glu-B1c*, *Glu-D1d* (10 исследованных образцов — 12,5% от общего количества) и *Glu-A1b*, *Glu-B1c*, *Glu-D1d* (11 исследованных образцов — 13,9% от общего количества). В то же время 14 образцов (17,7%) оказались неоднородными по аллельному составу генов, кодирующих глютенины. В частности 5 образцов (6,3%) оказались неоднородными по аллелям А-генома, 7 (8,9%) — В-генома, 1 образец (1,3%) — одновременно А- и D-генома и 1 образец (1,3%) — одновременно А-, В- и D-генома.

Таблица 1

Аллельные варианты генов пуриноидолинов *Pina-D1* и *Pinb-D1* в коллекционных образцах озимой пшеницы

Пуриноидолин А	Пуриноидолин В	Названия образцов	Количество образцов (%)
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	Акорд, Альбатрос одесский, Ариадна, Аскет, Багира, Барвина, Благодарна, Богданка, Борвий (образец 1), Борвий (образец 2), Бунчук, Видрада, Вильшана, Герта, Годувальныця одесская, Доброчын, Дон 95, Донская полукарликовая, Донской сюрприз, Ермак, Ершовская 11, Жемчужина Поволжья, Зарница, Заграва одесская (образец 1), Заграва одесская (образец 2), Заможность, Истина одесская, Калита, Кармен, Козачий атаман, Короганка, Левобережная 1, Лорд, Миронивська сторична, Наусель, Новоеершовская, Одесская 200, Памяти Калиненко, Подолянка, Полевик, Почаивка, Проза, Роксолана, Ростовчанка 3, Сагайдак, Селянка одесская, Синтетик, Славна, Турунчук, Ужинок, Уникум, Утес, Хвест, Хоревица (образец 1), Хоревица (образец 2), Элегия (образец 1), Элик, Эпоха одесская, Юнона, Яворина, Ярославна, Balaton, Catalus, Cubus, Dromos, F.594, Faur, Lupus, Miranda, Saturnus, Skagen	71 (89,9%)
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1c</i>	Придесняньска напивкарликова, Acratos, Perfect	3 (3,8%)
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>	Элегия (образец 2), Co 207, Emmitt, FT Wonder, Samurai	5 (6,3%)

Таблица 2

Аллельные варианты генов пуриноидолинов *Pina-D1* и *Pinb-D1* в селекционных образцах озимой пшеницы

Пуриноидолин А	Пуриноидолин В	Названия образцов	Количество образцов (%)
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	КСИ-17 № 1, КСИ-17 № 2, КСИ-17 № 3, КСИ-17 № 4, КСИ-17 № 5, КСИ-17 № 6, КСИ-17 № 7, КСИ-17 № 11, КСИ-17 № 12, КСИ-17 № 13, КСИ-17 № 15, КСИ-17 № 16, Л-1155, Л-1157, Л-1163, Л-1229, Л-1312, Л-1326, Лютесценс 1227, ПСИ 14 № 6, ПСИ 15 № 9, ПСИ 16 № 8, ПСИ 16 № 12, ПСИ 16 № 14, ПСИ 17 № 28/1, ПСИ 17 № 30/1, ПСИ 17 № 31, ПСИ 17 № 32, ПСИ 17 № 38, W-552/12, W-237/12, 0560 (Cubus x Kriss), 0595 ((Корнет x Капылянка) x Московский карлик), 89/20-11 ((ВхБ) x STH), ЭW, KW, MP (18) № 1 (0560), MP (18) № 2 (07160 73/1-11), MP (18) № 8 (0216 89/0-11), MP (18) № 10 (1361 KW), MP (18) № 11 (1360 ЭW)	41 (58,5%)
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b+</i> <i>Pinb-D1d</i>	Л-1062, ПСИ 17 № 36	2 (2,9%)
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b+</i> <i>Pinb-D1f</i>	59/4-12 (Turbin x Leo 0949)	1 (1,4%)
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1c</i>	HW, MP (18) № 6 (die 61220W)	2 (2,9%)
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>	07128 (Bison x Marabu), 018 (Контур x Щара)	2 (2,9%)
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d +</i> <i>Pinb-D1f</i>	КСИ-17 № 14	1 (1,4%)

Продолжение табл. 2

Пуриноидлин А	Пуриноидлин В	Названия образцов	Количество образцов (%)
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1f</i>	КСИ-17 № 8, КСИ-17 № 9, КСИ-17 № 10St, ПСИ 16 № 3, ПСИ 16 № 4, ПСИ 16 № 13, ПСИ-17 № 26, ПСИ-17 № 27, ПСИ-17 № 28, ПСИ-17 № 29, ПСИ 17 № 30, ПСИ 17 № 33, ПСИ 17 № 34, ПСИ 17 № 35, ПСИ 17 № 37, ПСИ 17 № 39, 32-3-09 (Прэстыж х STH 735), CW, МР (18) № 3 (47/1-09), МР (18) № 9 (0311 32/2-09), МР (18) № 12 (1363 CW)	21 (30,0%)

Таблица 3

Частота встречаемости генотипов среди исследованных коллекционных образцов, итоговая оценка их хлебопекарного качества

Генотип	Названия образцов	Общее количество образцов	Частота	Итоговая оценка (в баллах)
<i>Glu-A1a, Glu-B1ak, Glu-D1d</i>	Альбатрос одесский, Борвий (образец 1), Борвий (образец 2), Вильшана, Калита, Полевик, Сагайдак, Юнона	8	10,0%	10
<i>Glu-A1b, Glu-B1ak, Glu-D1d</i>	Благодарна, Дон 95, Заграва одесская (образец 1), Заграва одесская (образец 2), Хвост	5	6,3%	10
<i>Glu-A1b, Glu-B1b, Glu-D1d</i>	Доброчынь, Короганка, Хоревица (образец 1), Хоревица (образец 2), Faur, Miranda	6	7,6%	10
<i>Glu-A1b, Glu-B1al, Glu-D1d</i>	Багира, Годувальныця одеська, Эпоха одесская	3	3,8%	10
<i>Glu-A1a/b, Glu-B1ak, Glu-D1d</i>	Истина одесская, Селянка одесская	2	2,5%	10
<i>Glu-A1b, Glu-B1ak/al, Glu-D1d</i>	Ужинок	1	1,3%	10
<i>Glu-A1a, Glu-B1ak/c, Glu-D1d</i>	Заможність	1	1,3%	9,5
<i>Glu-A1b, Glu-B1ak/c, Glu-D1d</i>	Ермак, Миронивська сторична	2	2,5%	9,5
<i>Glu-A1b, Glu-B1b/c, Glu-D1d</i>	Ариадна	1	1,3%	9,5
<i>Glu-A1a, Glu-B1c, Glu-D1d</i>	Бунчук, Донская полукарликовая, Новоеершовская, Подолянка, Почаивка, Придеснянская напикварликова, Проза, Роксолана, Утес, Saturnus	10	12,5%	9
<i>Glu-A1b, Glu-B1c, Glu-D1d</i>	Барвина, Богданка, Донской сюрприз, Ершовская 11, Козачий атаман, Левобережная 1, Наусель, Одесская 200, Памяти Калиненко, Турунчук, Ярославна	11	13,9%	9
<i>Glu-A1b/c, Glu-B1ak, Glu-D1d</i>	Жемчужина Поволжья	1	1,3%	9
<i>Glu-A1a/b, Glu-B1c, Glu-D1d</i>	Видрада	1	1,3%	9
<i>Glu-A1a/b, Glu-B1c, Glu-D1a/d</i>	F.594	1	1,3%	8
<i>Glu-A1b/c, Glu-B1c, Glu-D1d</i>	Зарница	1	1,3%	8

Продолжение табл. 3

Генотип	Названия образцов	Общее количество образцов	Частота	Итоговая оценка (в баллах)
<i>Glu-A1c, Glu-B1ak, Glu-D1d</i>	Герта	1	1,3%	8
<i>Glu-A1b, Glu-B1d, Glu-D1d</i>	Кармен	1	1,3%	8
<i>Glu-A1a, Glu-B1d, Glu-D1d</i>	Со 207, Perfect	2	2,5%	8
<i>Glu-A1c, Glu-B1f, Glu-D1d</i>	Cubus	1	1,3%	8
<i>Glu-A1b/c, Glu-B1ak/c, Glu-D1a/d</i>	Синтетик	1	1,3%	7,5
<i>Glu-A1c, Glu-B1ak/c, Glu-D1d</i>	Skagen	1	1,3%	7,5
<i>Glu-A1c, Glu-B1c, Glu-D1d</i>	Акорд, Ростовчанка 3, Элик, Acratos, Lupus	5	6,3%	7
<i>Glu-A1b, Glu-B1c, Glu-D1a</i>	Лорд	1	1,3%	7
<i>Glu-A1a, Glu-B1c, Glu-D1a</i>	Balaton, Dromos, Emmitt, FT Wonder	4	5,1%	7
<i>Glu-A1a, Glu-B1c/d, Glu-D1a</i>	Samurai	1	1,3%	6,5
<i>Glu-A1c, Glu-B1d, Glu-D1d</i>	Элегия (образец 1), Элегия (образец 2)	2	2,5%	6
<i>Glu-A1a, Glu-B1d, Glu-D1a</i>	Славна	1	1,3%	6
<i>Glu-A1b, Glu-B1d, Glu-D1a</i>	Уникум, Яворина	2	2,5%	6
<i>Glu-A1c, Glu-B1c, Glu-D1a</i>	Аскет, Catalus	2	2,5%	5

Среди селекционных образцов выявлено 30 различных генотипов. Как видно из табл. 4, чаще в исследованной коллекции встречаются селекционные линии, обладающие генотипом *Glu-A1c, Glu-B1d, Glu-D1d* — 22 исследованных образца, что составляет 31,4% от общего количества. При этом 12 образцов (17,1%) оказались неоднородными по аллельному составу генов, кодирующих глютенины. В частности, 1 образец (1,4%) оказался неоднородным по составу аллелей генов А-генома, 2 образца (2,9%) — В-генома, 4 образца (5,8%) — D-генома. Неоднородными по аллелям одновременно А- и В-генома были 2 образца (2,9%), А- и D-генома — 1 образец (1,4%), А-, В- и D-генома — 2 образца (2,9%). В целом же все коллекционные и селекционные образцы были распределены по 46 генотипам.

На основании полученных данных определена суммарная оценка хлебопекарных качеств образцов пшеницы (табл. 3, 4). Чем выше оценка, тем более высокими хлебопекарными качествами обладает тот или иной образец [18, 19]. Анализ коллекционных образцов озимой пшеницы показал, что суммарная оценка хлебопекарных качеств варьировала в интервале от 5 (Аскет, Catalus) до 10 баллов (Альбатрос одесский, Багира, Благодарна, Борвий (образец 1), Борвий (образец 2), Вильшана, Годувальныця одеська, Доброчын, Дон 95, Заграва одесская (образец 1), Заграва одесская (образец 2), Истина одесская, Калита, Короганка, Полевик, Сагайдак, Селянка одесская, Ужинок, Хвост, Хоревица (образец 1), Хоревица (образец 2), Эпоха одесская, Юнона, Faur, Miranda) (табл. 3). При этом среди них значительная доля образцов — 52 (65,9%) — обладала высокими

Таблица 4

Частота встречаемости генотипов среди исследованных селекционных образцов, итоговая оценка их хлебопекарного качества

Генотип	Названия образцов	Общее количество образцов	Частота	Итоговая оценка (в баллах)
<i>Glu-A1a/b, Glu-B1ak, Glu-D1d</i>	KW	1	1,4%	10
<i>Glu-A1a, Glu-B1f, Glu-D1d</i>	ПСИ 17 № 28/1	1	1,4%	10
<i>Glu-A1b, (7+8*), Glu-D1d</i>	59/4-12 (TurbinxLeo 0949)	1	1,4%	10
<i>Glu-A1b, Glu-B1ak, Glu-D1d</i>	MP (18) № 10 (1361 KW)	1	1,4%	10
<i>Glu-A1b, Glu-B1b, Glu-D1d</i>	W-552/12, W-237/12	2	2,9%	10
<i>Glu-A1b, Glu-B1c/f, Glu-D1d</i>	Л-1062	1	1,4%	9,5
<i>Glu-A1a, Glu-B1c/u, Glu-D1d</i>	Л-1312	1	1,4%	9,5
<i>Glu-A1a, Glu-B1c, Glu-D1d</i>	Л-1229, Л-1155, Лютесценс 1227	3	4,3%	9
<i>Glu-A1a, Glu-B1c, Glu-D1a/d</i>	Л-1157	1	1,4%	8
<i>Glu-A1a, Glu-B1d, Glu-D1d</i>	КСИ-17 № 1, Л-1326 89/20-11 ((ВхБ)хСТН)	3	4,3%	8
<i>Glu-A1c, Glu-B1ak, Glu-D1d</i>	ПСИ 16 № 14, ПСИ-17 № 31	2	2,9%	8
<i>Glu-A1c, Glu-B1b, Glu-D1d</i>	ПСИ-17 № 32	1	1,4%	8
<i>Glu-A1c, Glu-B1f, Glu-D1d</i>	MP (18) № 2 (07160 73/1-11), ПСИ 17 № 30/1	2	2,9%	8
<i>Glu-A1a/c, Glu-B1ak/d, Glu-D1d</i>	018 (КонтурхЩара)	1	1,4%	8
<i>Glu-A1c, Glu-B1u, Glu-D1d</i>	КСИ-17 № 16	1	1,4%	8
<i>Glu-A1a/c, Glu-B1c, Glu-D1a/d</i>	Л-1163	1	1,4%	7
<i>Glu-A1b, Glu-B1c, Glu-D1a</i>	HW	1	1,4%	7
<i>Glu-A1c, Glu-B1c, Glu-D1d</i>	КСИ-17 № 2, КСИ-17 № 3, КСИ-17 № 15, ПСИ 14 № 6, 0595 ((КорнетхКапылянка)х Московский карлик), MP (18) № 6 (die 61220W), MP (18) № 11 (1360 ЭW)	7	10,0%	7
<i>Glu-A1a/c, Glu-B1b/d, Glu-D1a/d</i>	КСИ-17 № 12	1	1,4%	7
<i>Glu-A1a/c, Glu-B1d/u, Glu-D1a/d</i>	КСИ-17 № 14	1	1,4%	7
<i>Glu-A1c, Glu-B1ak, Glu-D1a/d</i>	ПСИ 16 № 8, ПСИ-17 № 38	2	2,9%	7
<i>Glu-A1a, Glu-B1d, Glu-D1a</i>	ПСИ 15 № 9, ПСИ 16 № 12, ПСИ-17 № 36, MP (18) № 8 (0216 89/0-11)	4	5,8%	6
<i>Glu-A1c, Glu-B1f, Glu-D1a</i>	0560 (CubusxKriss), MP (18) № 1 (0560)	2	2,9%	6

Продолжение табл. 4

Генотип	Названия образцов	Общее количество образцов	Частота	Итоговая оценка (в баллах)
<i>Glu-A1c, Glu-B1d, Glu-D1d</i>	КСИ-17 № 4, КСИ-17 № 5, КСИ-17 № 8, КСИ-17 № 9, КСИ-17 № 10St, ПСИ 16 № 3, ПСИ 16 № 4, ПСИ 16 № 13, ПСИ-17 № 26, ПСИ-17 № 27, ПСИ-17 № 28, ПСИ-17 № 29, ПСИ-17 № 33, ПСИ-17 № 34, ПСИ-17 № 35, ПСИ-17 № 37, ПСИ-17 № 39 07128 (BisonxMarabu), 32-3-09 (ПрэстыжxSTH 735), МР (18) № 3 (47/1-09), МР (18) № 9 (0311 32/2-09), МР (18) № 12 (1363 CW)	22	31,6%	6
<i>Glu-A1c, Glu-B1h, Glu-D1d</i>	КСИ-17 № 11	1	1,4%	6
<i>Glu-A1b, Glu-B1d, Glu-D1a</i>	КСИ-17 № 7	1	1,4%	6
<i>Glu-A1a/c, Glu-B1d/f, Glu-D1a</i>	КСИ-17 № 13	1	1,4%	6
<i>Glu-A1c, Glu-B1c, Glu-D1a</i>	ЭW	1	1,4%	5
<i>Glu-A1c, Glu-B1d, Glu-D1a/d</i>	ПСИ-17 № 30	1	1,4%	5
<i>Glu-A1c, Glu-B1d, Glu-D1a</i>	КСИ-17 № 6, CW	2	2,9%	4

(итоговая оценка — 9–10 баллов) хлебопекарными качествами (рис. 1). Доля образцов со средними хлебопекарными качествами (итоговая оценка — 7–8,5 баллов) составила 24,1%, низкими (итоговая оценка —

6,5 баллов и ниже) — 10,0%. Основной негативный эффект на суммарную оценку оказывало наличие аллелей *Glu-A1c*, *Glu-B1c* и *Glu-D1a*, а в особенности — их совместное присутствие.

Распределение коллекционных образцов по индексу качества

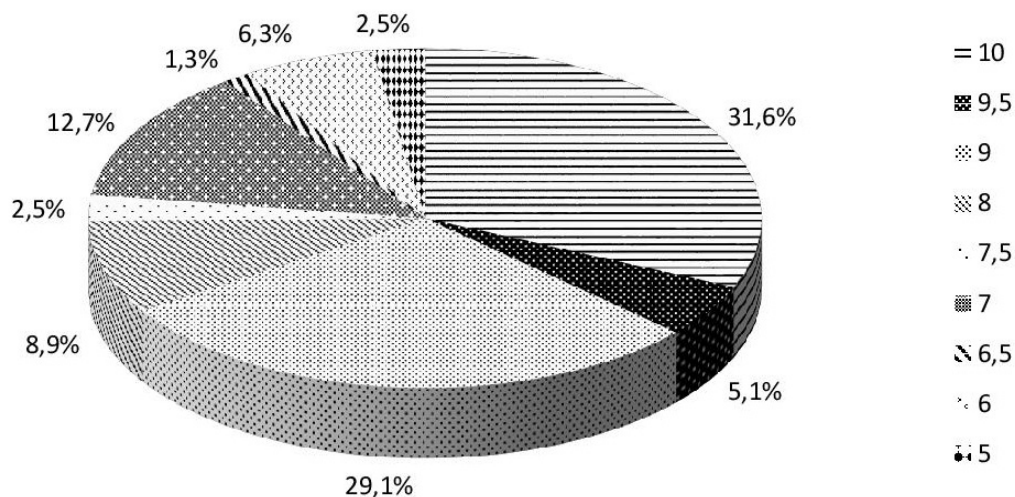


Рис. 1. Доля коллекционных образцов озимой пшеницы, соответствующих определенной итоговой оценке хлебопекарных качеств (индексу качества)

Среди селекционных образцов озимой пшеницы суммарная оценка хлебопекарных качеств варьировала в интервале от 4 (КСИ-17 № 6, CW) до 10 баллов (KW, W-552/12, W-237/12, 59/4-12 (TurbinxLeo 0949) (табл. 4). Высокими хлебопекарными качествами (итоговая оценка — 9–10 баллов) характеризовались 11 (15,7%) селекционных образцов, средними (итоговая оценка — 7–8 баллов) — 24 (34,3%). Доля образцов с низкими (итоговая оценка — 6 баллов и ниже) хлебопекарными качествами составила 50,0% (рис. 2). Основным негативный эффект на суммарную оценку оказывало наличие аллелей *Glu-A1c*,

Glu-B1d и *Glu-D1a*, а в особенности — их совместное присутствие. Так как наибольший вклад в качество производимой муки вносит аллельный состав локуса *Glu-D1*, при равных баллах преимущество, вероятнее всего, будет иметь сорт (линия), в геноме которого содержится аллель *Glu-D1d*.

В результате анализа аллельного состава генов короткостебельности *Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8* были выявлены перспективные образцы, несущие аллели *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, приводящие к снижению высоты растения, а также аллель 192 маркера WMS261, сцепленный с аллелем *Rht8c* (табл. 5, 6).

Распределение селекционных образцов по индексу качества

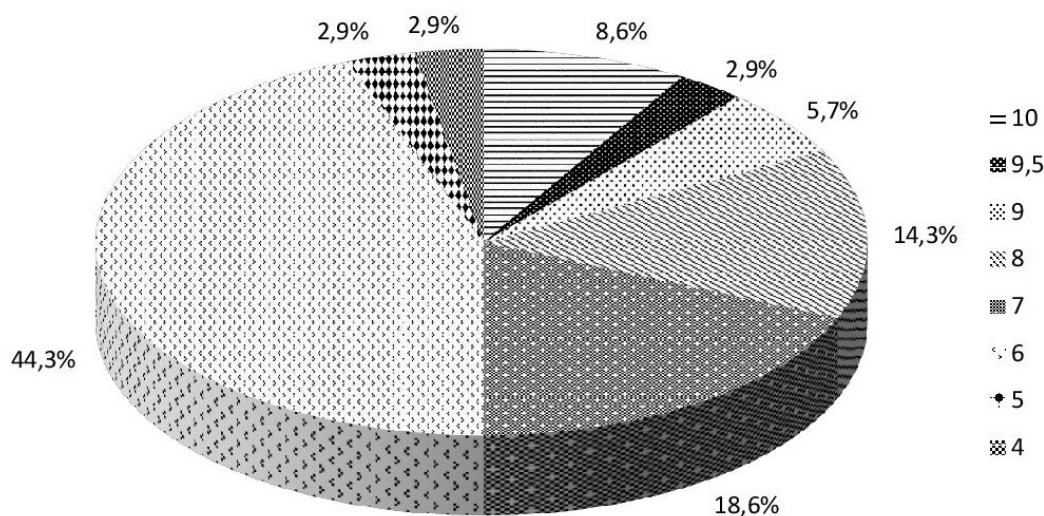


Рис. 2. Доля селекционных образцов озимой пшеницы, соответствующих определенной итоговой оценке хлебопекарных качеств (индексу качества)

Таблица 5

Источники аллелей *Rht-B1b* и *Rht-D1b* и *Rht8c*, ассоциированных со снижением высоты растения, среди коллекционных образцов озимой пшеницы

Вид аллеля (сочетание аллелей)	Названия образцов	Количество образцов (%)
<i>Rht-B1b</i>	Кармен, Юнона Miranda	3 (3,8%)
<i>Rht-B1b</i> + <i>Rht8c</i>	Бунчук, Годувальныця одеська, Донская полукарликовая, Донской сюрприз, Ермак, Истина одесская, Наусель, Одесская 200, Памяти Калиненко, Полевик, Почаивка, Приднесьняньска напивкарликова, Славна, Уникум, Яворина Faur	16 (20,2%)

Продолжение табл. 5

Вид аллеля (сочетание аллелей)	Названия образцов	Количество образцов (%)
<i>Rht-D1b</i>	Акорд Со 207, Cubus, Samurai, Skagen	5 (6,3%)
<i>Rht-D1b + Rht8c</i>	Альбатрос одесский, Багира, Благодарна, Богданка, Борвий (образец 1), Борвий (образец 2), Доброчын, Заграва одесская (образец 1), Заграва одесская (образец 2), Калита, Роксолана, Турунчук, Ужинок, Хвост, Эпоха одесская Emmitt	16 (20,2%)
<i>Rht8c</i>	Ариадна, Аскет, Барвина, Видрада, Вильшана, Герта, Дон 95, Ершовская 11, Жемчужина Поволжья, Заможнисть, Козачий атаман, Короганка, Левобережная 1, Лорд, Новоеершовская, Подолянка, Селянка одесская, Синтетик, Ростовчанка 3, Сагайдак, Утес, Хоревица (образец 1), Хоревица (образец 2), Элегия (образец 2), Ярославна F.594	26 (32,9%)

Таблица 6

Источники аллелей *Rht-B1b* и *Rht-D1b* и *Rht8c*, ассоциированных со снижением высоты растения, среди селекционных образцов озимой пшеницы

Вид аллеля	Названия образцов	Количество образцов (%)
<i>Rht-B1b</i>	W-552/12	1 (1,4%)
<i>Rht-D1b</i>	КСИ-17 № 3, ПСИ 14 № 6, ПСИ 15 № 9, ЭW, 89/20-11 ((ВхБ) x STH), 0560 (CubusxKriss), MP (18) № 1 (0560), MP (18) № 2 (07160 73/1-11), MP (18) № 6 (die 61220W), MP (18) № 8 (0216 89/0-11), MP (18) № 11 (1360 ЭW)	11 (15,7%)
<i>Rht8c</i>	КСИ-17 № 5, КСИ-17 № 6, КСИ-17 № 10St, ПСИ 16 № 3, ПСИ 16 № 4, ПСИ 16 № 13, ПСИ 16 № 14, ПСИ-17 № 27, ПСИ-17 № 28, ПСИ-17 № 34, ПСИ-17 № 35, ПСИ-17 № 37, CW, KW, W-237/12, 018 (Контур x Щара), 32-3-09 (Прэстыж x STH 735), 59/4-12 (TurbinxLeo 0949), MP (18) № 10 (1361 KW)	19 (27,1%)

Следует отметить, что растения линии ПСИ-17 № 38, несмотря на отсутствие в их геномах генов короткостебельности, обладают небольшой высотой (95 см) и данная линия также может представлять ценность для селекционного процесса.

Полученные на предыдущих этапах данные об аллельном составе генов, влияющих на качество зерна (*Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1*, а также *Pina-D1* и *Pinb-D1*) и высоту растения (*Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8*), позволили выделить перспективные образцы с комплексом генов для включения в селекционный процесс.

Поскольку исследование образцов по аллельному составу генов *Pina-D1* и *Pinb-D1*, оказывающих влияние на твердозерность, показало, что все сорта и линии являются твердозерными, то выделение перспективных образцов проводилось на основании данных по аллельному составу генов, кодирующих запасные белки семян глютенины *Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1*, и генов короткостебельности *Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8*.

Перечень образцов, обладающих высокими хлебопекарными качествами (индекс качества 9–10), несущих в своих генотипах гены короткостебельности, приведены в табл. 7, 8.

Таблица 7

Характеристика коллекционных образцов озимой пшеницы, перспективных по аллельному составу генов, кодирующих запасные белки семян глютеины *Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1*, а также генов короткостебельности *Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8*

Названия образцов	Индекс качества по аллельному составу глютеинов (в баллах)	Аллели генов короткостебельности	Общее количество образцов	Частота
Годувальныця одеська, Истина одесская, Полевик	10	<i>Rht-B1b</i> + <i>Rht8c</i>	3	3,8%
Багира, Благодарна, Доброчын, Заграва одесская (образец 1), Заграва одесская (образец 2), Калита, Ужинок, Хвест, Эпоха одесская	10	<i>Rht-D1b</i> + <i>Rht8c</i>	9	11,4%
Юнона, Miranda	10	<i>Rht-B1b</i>	1	1,3%
Вильшана, Дон 95, Короганка, Сагайдак, Селянка одесская, Хоревица (образец 1), Хоревица (образец 2)	10	<i>Rht8c</i>	7	8,9%
Ермак	9,5	<i>Rht-B1b</i> + <i>Rht8c</i>	1	1,3%
Ариадна, Заможність	9,5	<i>Rht8c</i>	2	2,5%
Бунчук, Донской сюрприз, Наусель, Одесская 200, Памяти Калиненко, Почаївка, Придеснянська напівкарликова	9	<i>Rht-B1b</i> + <i>Rht8c</i>	7	8,9%
Богданка, Роксолана, Турунчук	9	<i>Rht-D1b</i> + <i>Rht8c</i>	3	3,8%
Барвина, Видрада, Ершовская 11, Жемчужина Поволжья, Козачий атаман, Левобережная 1, Новоершовская, Подолянка, Утес, Ярославна	9	<i>Rht8c</i>	10	12,5%

Таблица 8

Характеристика селекционных образцов озимой пшеницы, перспективных по аллельному составу генов, кодирующих запасные белки семян глютеины *Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1*, а также генов короткостебельности *Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8*

Названия образцов	Индекс качества по аллельному составу глютеинов (в баллах)	Аллели генов короткостебельности	Общее количество образцов	Частота
W-552/12	10	<i>Rht-B1b</i>	1	1,4%
KW, W-237/12, 59/4-12 (TurbinxLeo 0949), MP (18) № 10 (1361 KW)	10	<i>Rht8c</i>	4	5,8%

Как видно из табл. 7 и 8, доля образцов, несущих в своих генотипах одновременно фаворитные аллели генов, кодирующих запасные белки семян глютеины, а также гены корот-

костебельности *Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8*, среди коллекционных образцов значительно выше (54,4% от всех исследованных), чем среди селекционных (7,2% от всех исследованных).

Результаты показывают, что селекционный процесс шел в направлении увеличения хлебопекарного качества зерна и снижения высоты растения.

В современной селекции пшеницы стратегию пирамидирования генов используют для решения широкого круга задач, например, для одновременного переноса генов устойчивости к различным заболеваниям с целью получения растений с комплексной устойчивостью к фитопатогенам [24]. Пирамидирование генов, предполагающее обычные обратные скрещивания, требует больших временных затрат и является трудоемким процессом [25]. Появление молекулярных маркеров значительно ускорило процесс объединения нескольких благоприятных аллелей в одном генотипе [24, 26]. Так, для пшеницы при помощи маркер-сопутствующей селекции удалось объединить фаворитные аллели генов устойчивости к листовой ржавчине [27–30], мучнистой росе [31, 32], Гессенской мухе [33], фузариозу колоса [34–36] и т. д. Tuagi et al. при помощи маркер-сопутствующей селекции удалось аккумулировать в индийской линии PBW343 гены устойчивости к трем видам ржавчины (листовой *Lr24*, стеблевой *Sr24* и полосатой *Yr36*) наряду с генами, влияющими на содержание белка в зерне (*Gpc-B1*), предуборочное прорастание семян (*QPhs.ccsu-3A.1*), массу зерна (*QGw.ccsu-1A.3*), и генами запасных белков семян глютеинов (*Glu-A1-1/Glu-A1-2*) [37].

Таким образом, использование методов маркер-сопутствующей селекции дает возможность одновременной интрогрессии (пирамидирования) нескольких количественных локусов / генов для улучшения существующих и создания новых сортов и тем самым повышает эффективность и результативность традиционных методов селекции [26].

Заключение

Исследован аллельный состав генов, влияющих на качество зерна (*Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1*, а также *Pina-D1* и *Pinb-D1*) и высоту растения (*Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8*), в коллекции из 79 коллекционных и 70 селекционных образцов озимой мягкой пшеницы. Среди них было выявлено 43 коллекционных и 5 селекционных образцов, обладающих высокими хлебопекарными качествами зерна (индекс качества 9–10) и одновременно несущих в своих геномах ал-

лели *Rht-B1b*, *Rht-D1b* и *Rht8c* генов короткостебельности, приводящие к снижению высоты растения. При исследовании коллекции по аллельному составу генов *Pina-D1* и *Pinb-D1*, оказывающих влияние на твердозерность, было показано, что все образцы являются твердозерными и несут в своих геномах различные мутации в гене *Pinb-D1*, что делает их пригодными для выпечки дрожжевого хлеба. Полученные данные могут быть использованы в селекционном процессе озимой пшеницы, направленном на создание короткостебельных сортов с высокими хлебопекарными качествами зерна.

Список использованных источников

1. Сельское хозяйство Республики Беларусь. Статистический сборник / Национальный статистический комитет Республики Беларусь. — 2018. — 235 с.
2. Хакимова, А. Г. Пуриноидолиты в связи с перспективами селекции мягкой пшеницы на качество и устойчивость: (обзор иностранной литературы) / А.Г. Хакимова, О.П. Митрофанова // Сельскохозяйств. биол. — 2009, № 1. — С. 3–15.
3. Giroux, M. J. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b / M.J. Giroux, C.F. Morris // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95, № 11. — P. 6262–6266.
4. Gale, K.R. Diagnostic DNA markers for quality traits in wheat / K.R. Gale // Journal of Cereal Science. — 2004. — Vol. 41. — P. 181–192.
5. Morris, C.F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness / C.F. Morris // Plant Mol. Biol. — 2002. — Vol. 48, № 5, 6. — P. 633–647.
6. Morris, C.F. Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats / C.F. Morris [et al.] // Crop Sci. — 2001. — Vol. 41, № 1. — P. 218–228.
7. Ahmad, M. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers / M. Ahmad // Theor. Appl. Genet. — 2000. — Vol. 101. — P. 892–896.
8. Ma, W. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat / W. Ma, W. Zhang, K.R. Gale // Euphytica. — 2003. — Vol. 134. — P. 51–60.

9. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / V. Korzun [et al.] // *Theor Appl Genet.* — 1998. — Vol. 96, № 8. — P. 1104–1109.
10. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening / A.J. Worland [et al.] // *Theor Appl Genet.* — 1998. — Vol. 96, № 8. — P. 1110–1120.
11. Plaschke, J. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers / J. Plaschke, M.W. Ganal, M.S. Röder // *Theor. Appl. Genet.* — 1995. — Vol. 91. — P. 1001–1007.
12. A Pseudo-Response Regulator is mis-expressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Beales [et al.] // *Theor Appl Genet.* — 2007. — Vol. 115. — P. 721–733.
13. Liu, S. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat / S. Liu, S. Chao, J.A. Anderson // *Theor Appl Genet.* — 2008. — Vol. 118, № 1. — P. 177–183.
14. PCR analysis of x- and y-type genes present at the complex *Glu-A1* locus in durum and bread wheat / D. Laflandra [et al.] // *Theor Appl Genet.* — 1997. — Vol. 94. — P. 235–240.
15. Schwarz, G. Development and validation of a PCR-based marker assay for negative selection of the HMW glutenin allele *Glu-B1-1d* (*Bx-6*) in wheat / G. Schwarz, F.G. Felsenstein, G. Wenzel // *Theor Appl Genet.* — 2004. — Vol. 109, № 5. — P. 1064–1069.
16. Evolutionary origin of the segmental duplication encompassing the wheat *GLU-B1* locus encoding the overexpressed *Bx7* (*Bx7OE*) high molecular weight glutenin subunit. / R. Ragupathy [et al.] // *Theor Appl Genet.* — 2008. — Vol. 116. — P. 283–296.
17. Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the *Glu-B1* locus in hexaploid wheat / Z.S. Lei [et al.] // *Journal of Cereal Science.* — 2006. — Vol. 43. — P. 94–101.
18. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties / P.I. Payne [et al.] // *Journal of the Science of Food and Agriculture.* — 1987. — Vol. 40. — P. 51–65.
19. Rogers, W.J. The HMW glutenin subunit and gliadin compositions of German-Grown wheat varieties and their relationship with bread-making quality / W.J. Rogers, P.I. Payne, K. Harinder // *Plant Breeding.* — 1989. — Vol. 103. — P. 89–100.
20. “Perfect” markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat / H. Ellis [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — Vol. 105, № 6, 7. — P. 1038–1042.
21. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / V. Korzun [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 1998. — Vol. 96, № 8. — P. 1104–1109.
22. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b / M.J. Giroux, C.F. Morris // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1998. — Vol. 95, № 11. — P. 6262–6266.
23. Lillemo, M. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe / M.A. Lillemo, C.F. Morris // *Theor Appl Genet.* — 2000. — Vol. 100. — P. 1100–1107.
24. Tester, M. Breeding technologies to increase crop production in a changing world / M. Tester, P. Langridge // *Science.* — 2010. — Vol. 327, № 5967. — P. 818–822.
25. Pyramiding genes/QTL for crop improvement using marker-aided selection (MAS) / P.K. Gupta // *Search for new genes.* — 2007. — P. 145–171.
26. Gupta, P.K. Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities / P.K. Gupta, P. Langridge, R.R. Mir // *Mol Breeding.* — 2010. — Vol. 26. — P. 145–161.
27. Cox, T.S. Leaf rust-resistance genes, *Lr41*, *Lr42* and *Lr43* transferred from *Triticum tauschii* to common wheat. / T.S. Cox, W.J. Raupp, B.S. Gill // *Crop Sci.* — 1994. — Vol. 34, № 339–343.
28. Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf-rust-resistance gene, *Lr9*, for marker-assisted selection in bread wheat / S.K. Gupta [et al.] // *Genome.* — 2005. — Vol. 48, № 5. — P. 823–830.

29. Marker-assisted selection for leaf rust resistance genes *Lr19* and *Lr24* in wheat (*Triticum aestivum* L.) / R. Singh [et al.] // J Appl Genet. — 2004. — Vol. 45, № 4. — P. 399–403.
30. Nocente, F. Evaluation of leaf rust resistance genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr24*, *Lr47* and their introgression into common wheat cultivars by marker-assisted selection / F. Nocente, L. Gazza, M. Pasquini // Euphytica. — 2007. — Vol. 155. — P. 329–336.
31. Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat / J. Liu [et al.] // Plant Breed. — 2000. — Vol. 119. — P. 21–24.
32. Wang, X.Y. Pyramiding and marker-assisted selection for powdery mildew resistance genes in common wheat / X.Y. Wang, P.D. Chen, S.Z. Zhang // Acta Genet Sin. — 2001. — Vol. 28. — P. 640–646.
33. Identification of RAPD markers for 11 Hessian fly resistance genes in wheat / I. Dweikat [et al.] // Theor Appl Genet. — 1997. — Vol. 94. — P. 419–423.
34. Tamburic-Ilincic, L. Fusarium ratings in Ontario Winter Wheat Performance Trial (OW-WPT) using an index that combines fusarium head blight symptoms and deoxynivalenol levels / L. Tamburic-Ilincic, D. Falk, A. Schaafsma // Czech J Genet Plant Breed. — 2011. — Vol. 47. — P. 115–122.
35. DNA marker analysis for pyramiding of Fusarium head blight (FHB) resistance QTLs from different germplasm / J.R. Shi [et al.] // Genetica. — 2008. — Vol. 133. — P. 77–84.
36. Phenotypic and marker-assisted evaluation of spring and winter wheat germplasm for resistance to Fusarium head blight / A. Badea [et al.] // Euphytica. — 2008. — Vol. 164. — P. 803–819.
37. Marker-assisted pyramiding of eight QTLs/genes for seven different traits in common wheat (*Triticum aestivum* L.) / S. Tyagi [et al.] // Mol Breeding. — 2014. — Vol. 34. — P. 167–175.

A.A. Famina, T.M. Dmitrieva, O.Yu. Urbanovich

USE OF MOLECULAR MARKERS IN WINTER WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) BREEDING TO ISOLATE THE SAMPLES PROSPECTIVE BY THEIR ALLELIC COMPOSITION OF GENES THAT DETERMINE THE BREAD-MAKING QUALITY OF GRAIN AND THE HEIGHT OF PLANTS

Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

The allelic composition of genes determining grain quality (*Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1*, as well as *Pina-D1* and *Pinb-D1*) and plant height (*Rht-B1*, *Rht-D1* and *Rht8*) in the collection of 79 varieties and 70 lines of winter wheat was investigated. 43 varieties and 5 lines with the high bread-making quality of grain (9–10 quality index) and simultaneously carrying the *Rht-B1b*, *Rht-D1b* and *Rht8c* alleles of dwarf genes that lead to a decrease in plant height were identified. All the samples studied are hard wheats and carry various *Pinb-D1* gene mutations in their genomes.

Key words: winter wheat, grain hardness, glutenins, stem dwarfing, bread-making quality of grain.

Дата поступления статьи: 30 января 2019 г.

Г.В. Мозгова¹, Н.Е. Хоружий¹, А.В. Амосова², Я.Э. Пилук³, В.М. Белявский³, С.Ю. Храмченко³,
О.В. Муравенко², В.А. Лемеш¹

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ РАПСА (*BRASSICA NAPUS*) В СВЯЗИ С МОРОЗОСТОЙКОСТЬЮ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: N.horuzhiy@igc.by

²Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН
Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32

³НПЦ НАН Беларуси по земледелию
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Выявлены ДНК-маркеры (*Bn0110*, *BoCCA1-1R1* и *BoCCA1-2R1*), позволяющие детектировать локусы количественных признаков и аллели генов, ассоциированные с повышенной и пониженной морозостойкостью озимого рапса. Выделены генотипы, маркированные по генам, ассоциированным с устойчивостью к низким температурам. Установлено, что 31 из 56 проанализированных образцов несут QTL *Bn0110*, ассоциированный с устойчивостью к пониженным температурам. Анализ сортов с помощью молекулярных маркеров, ассоциированных с аллелями генов генома *S. B. napus*, определяющих устойчивость и восприимчивость генотипов к низким температурам, показал, что аллель *BoCCA1-1*, характерный для устойчивых к холоду генотипов, содержится в геномах 10 из 56 проанализированных образцов. При этом *BoCCA1-2R1*, характерный для восприимчивых генотипов, присутствует у 46 из 56 образцов, что необходимо учитывать при подборе родительских пар в селекции на морозостойкость. Молекулярно-цитогенетический анализ выявил сортовую специфичность сочетаний полиморфных вариантов разных хромосом в кариотипах озимых сортов рапса. У наиболее зимостойких сортов российской (Норд и Северянин) и белорусской (Зорны) селекции обнаружено сходство по распределению и размерам выявленных хромосомных маркеров и идентичность сочетаний полиморфных вариантов гомологичных хромосом, несущих локусы 45S и/или 5S рДНК. Наиболее широкий хромосомный полиморфизм по локализации и размерам локусов 45S и 5S рДНК наблюдается у самых зимостойких сортов озимого рапса, которые широко районированы, в том числе в районах рискованного земледелия (Красноярский край, Россия).

Ключевые слова: рапс, морозостойкость, молекулярные и хромосомные маркеры.

Введение

Влияние низких температур на жизнедеятельность растений (холодовой стресс) определяется совокупностью двух стрессовых факторов — охлаждения (воздействия низких положительных температур в диапазоне от 0 до 15 °С) и замораживания (воздействия температур ниже 0 °С) [1, 2]. Известно, что изменение температуры в зимний и весенний период влияет на все важнейшие стадии репродуктивного цикла, включая гаметогенез, опыление, оплодотворение и эмбриогенез [3]. Выращивание новых сортов в определенных условиях окружающей среды определяет необходимость создания сортов с соответствующим набором

признаков и разработки агротехнических приемов, которые обеспечат устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам, а также максимальную урожайность.

В работе [1] описаны два механизма устойчивости к замораживанию — избегание формирования кристаллов льда в тканях и активация специфических защитных механизмов, позволяющих адаптироваться к низкотемпературным условиям. Некоторые растения могут избежать замораживания путем переохлаждения (охлаждение до температур ниже нуля без формирования льда), значительно увеличивая концентрацию осмолитов внутри клетки (гидрофильных белков, углеводов, бетаина, про-

лина и др.), которые связывают воду, что препятствует образованию кристаллов льда [4]. Однако было обнаружено, что это состояние является временным и неспособно противостоять значительному понижению температуры, а также неэффективно, если низкая температура сохраняется в течение длительного периода времени. Активация механизмов устойчивости представляет собой сложный процесс, который приводит к изменению метаболизма и экспрессии множества генов растения [5].

Установлено, что во время холодового стресса происходит изменение текучести липидов клеточной мембраны, что приводит к потере пластичности и ужесточению ее структуры [6]. Это является необходимым условием для передачи холодового сигнала внутрь клетки. Активация неизвестных кальциевых каналов в плазматической и вакуолярной мембранах приводит к потоку ионов кальция из апопласта и вакуоли в цитозоль. Значительное повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме приводит к активации кальмодулинов, кальций-зависимых протеинкиназ, протеинфосфатаз, фосфолипазы С и MAP-киназного каскада [3]. В конечном итоге холодовый сигнал трансдуцируется в ядро, где происходит фосфорилирование транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию генов холодового ответа [7]. Например, у *B. napus* установлена холодовая индукция промотора BN115 [8], необходимым условием для которой является приток ионов кальция. Значительное влияние на метаболизм растений во время холодового ответа оказывает изменение экспрессии генов синтеза растительных гормонов (салициловой и абсцизовой кислот, гиббереллинов [7], что приводит к ингибированию роста и запуску систем захвата реактивных форм кислорода, повреждающих различные внутриклеточные структуры.

У морозоустойчивых растений семейства *Brassicaceae* в плазматических мембранах повышено содержание ненасыщенных жирных кислот, что обуславливает фазовый переход липидов мембран из жидкокристаллического состояния в гель при отрицательных температурах [3]. В состоянии геля резко снижается проницаемость мембран. Кроме того, у морозоустойчивых растений активируется синтез криопротекторов — гидрофильных белков, моно- и олигосахаридов, пролина, бетаина

и др. Вода, входящая в состав гидратных оболочек этих веществ, не замерзает и не выходит из клеток. В клеточной стенке эффективными криопротекторами являются гемицеллюлозы. Они обволакивают растущие кристаллы льда, замедляя их рост и препятствуя формированию новых центров нуклеации льда. Факторы транскрипции и эффекторные гены, участвующие в холодовом ответе, в совокупности называются генами, регулируемые холодом (COR) [5]. У *A. thaliana* охарактеризованы индуцируемые холодом гены *COR78* и *COR15a* [9]. Факторы, связывающие С-повторы (C-repeat binding factor, CBF), у растений семейства *Brassicaceae* являются ключевыми элементами ответа на холодовый стресс. Их экспрессия начинается уже через 15 минут холодового воздействия. Факторы CBF связываются с промоторами генов, регулируемых холодом, и активируют их экспрессию, что приводит к повышению морозоустойчивости растения. Роль факторов CBF в холодовом ответе подчеркивается тем фактом, что сверхэкспрессия гена *CBF1 A. thaliana* у трансгенного табака приводит к приобретению последним конститутивной морозоустойчивости [4, 9].

Методы скрининга, позволяющие точно оценить зимостойкость, имеют решающее значение для программ исследований озимых культур. Выживаемость в полевых условиях, измеряемая как процент растений, переживших зиму, является наиболее часто используемым методом [10]. Существующие трудности проведения полевых испытаний стимулировали интерес к разработке методов, которые дополнили бы полевой скрининг.

Учитывая тот факт, что большинство генов, отвечающих за устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессовым факторам, являются количественными [11], одним из подходов для разработки новых холодоустойчивых сортов является идентификация специфических генетических детерминант устойчивости к холоду, интрогрессия обнаруженных локусов в геномы элитных сортов, а также селекция желаемых линий при помощи молекулярных маркеров.

Рапс (*Brassica napus* L. 2n = 38 ААСС) является хозяйственно-ценной культурой и природным аллополиплоидом, геном которого образовался в результате спонтанного скрещивания

капусты огородной (*Brassica oleracea* L., $2n = 18$, CC) и сурепицы (*Brassica rapa* L., $2n = 20$, AA) с последующим удвоением числа хромосом [12]. А- и С-субгеномы рапса являются близкородственными [13]. Поскольку рапс и сурепица являются также родственниками *A. thaliana* и показана значительная гомология между их геномами, это позволяет разрабатывать молекулярные маркеры к сложно наследуемым признакам, например, определяющим качественную и количественную устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам. Было обнаружено, что у сурепицы отсутствует около 35% генов, входящих в состав генома *A. thaliana*, однако гены, кодирующие белки, участвующие в сигнальной трансдукции, а также транскрипционные факторы сохраняют высокий уровень гомологии [3]. Расшифровка последовательностей генома растений семейства *Brassicaceae* также увеличивает возможность детекции полиморфизмов по многим агрономически важным генам-кандидатам, в том числе по последовательностям, связанным с морозоустойчивостью.

Генетическая изменчивость существующего селекционного материала рапса ограничена вследствие интенсивной селекции по специфическим признакам, определяющим качество масла и семян. Во многих исследованиях продемонстрирована пригодность использования молекулярных маркеров для оценки генетической изменчивости рапса [14]. Большинство генетических карт, имеющих на данный момент, построены на основе RFLP- и SRAP-маркеров. Также продемонстрирована эффективность использования SSR-маркеров для четкой дифференциации ярового и озимого рапса [15].

Молекулярные методы анализа микросателлитных последовательностей (SSR), однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), маркерных экспрессирующихся последовательностей (EST) и др. широко используются для идентификации генов растений, имеющих важное экономическое значение [16].

Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) в кариотипе рапса выявляется большое число сайтов локализации рибосомных генов, которые используются для идентификации хромосом [17, 18]. Ранее было также обнаружено наличие меж- и внутрисортного

полиморфизма по числу и распределению 45S и 5S рДНК локусов у *B. napus* различной селекции, который был выше у озимых сортов по сравнению с яровыми [18].

Для понимания функциональной геномики абиотического стресса важным является осуществление научно-исследовательских инициатив, связанных с изучением стресс-индуцируемых генов в различных условиях окружающей среды, поскольку механизмы стрессовых воздействий и задействованные пути синтеза метаболитов в таких условиях могут отличаться. Следовательно, будут отличаться и подходы к отбору селекционно-ценных форм. Вместе с тем межинститутских инициатив по поиску молекулярных маркеров морозоустойчивости с применением комплексного подхода по анализу сложного генома растений семейства *Brassicaceae* немного. В связи с этим наше исследование, направленное на изучение внутривидового генетического полиморфизма сортов озимого рапса с помощью SSR и SCAR маркеров, а также хромосомного полиморфизма в кариотипах с помощью FISH с зондами 45S и 5S рДНК и DAPI-дифференциального окрашивания с целью поиска молекулярных и хромосомных маркеров, ассоциированных с морозостойкостью, является новым и актуальным.

Материалы и методы

Материалом для молекулярных исследований послужила коллекция сортов озимого рапса, выведенных в разных регионах мира (56 образцов) и различных по степени устойчивости к низким температурам (табл. 1). Цитогенетические исследования выполнены на шести озимых сортах российской и белорусской селекции (табл. 2). Образцы были получены из коллекций НПЦ по земледелию НАН Беларуси (РБ), ВИР им. Н.И. Вавилова и Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса (РФ).

Выделение геномной ДНК из листьев индивидуальных растений рапса проводилось при помощи набора реактивов Genomic DNA Purification Kit согласно инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific). Концентрацию и чистоту (определение отношения A260/A280) ДНК определяли при помощи спектрофотометра Implen NP60.

Таблица 1

Коллекция сортов озимого рапса

Название сорта	Страна происхождения	Название сорта	Страна происхождения
Аранго	Франция	Столичный	Россия
Аризона	Франция	Лауреат	Россия
Атензо	Франция	Горизонт	Россия
Атора	Германия	НОРД	Россия
Зенит	Беларусь	Северянин	Россия
Зорны	Беларусь	Schnitt gruner	Германия
Импрессион	Германия	Sutton's Favourite	Великобритания
Ментор	Германия	Asparagus	Великобритания
Мерседес	Германия	Schnitt brauner	Германия
Минерва	Германия	Tall Scotch Curled	Канада
Коллинс	Германия	Pabularia	Новая Зеландия
Ориолус	Германия	Hungry gar	Великобритания
Сафер	Германия	Васэ Абурана	Япония
Тайфун	Германия	Кавангапе	Япония
Трумф	Германия	Dunne	Германия
Трой	Германия	Orig Senraps	Швеция
Туре	Германия	Forrajero	Перу
Фенцер	Германия	Ветразь	Беларусь
Эдимакс	Германия	Svalof Victoria	Швеция
Делфи	Германия	Местная	Россия
Эйнштейн	Германия	Rapido	Финляндия
Кристалл	Германия	Gruber	Финляндия
Адмирал	Франция	Латвийская 6	Латвия
Артога	Франция	Злата	Российская Федерация
Кларус	Германия	Okute Oosaka Shirona	Япония
Куга	Германия	Goseki Late	Япония
Альбатрос	Франция	Ova Dauhnfeldt	Дания
Андерсон	Франция	Brunstadnepe	Норвегия

Целевые фрагменты ДНК амплифицировали с локус-специфическими парами праймеров, фланкирующими участки последовательностей генов, детерминирующих различия в

зимостойкости и устойчивости к замораживанию у рапса.

ПЦР проводили на амплификаторе Simpli-Amp Thermal Cycler (Applied Biosystems) со

следующими условиями реакции: 95 °C — 5 мин; 35 циклов: 95 °C — 30 с, 60 °C — 30 с, 72 °C — 1 мин; 72 °C — 5 мин. Реакционная смесь содержала 100 нг геномной ДНК, 1 μ M dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 10x ПЦР-буфер (650 mM Tris-HCl, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 0,2% твин-20, pH 8,8), 0,25 μ M каждого праймера и 1 U Taq-полимеразы (Праймтех, Республика Беларусь) в общем объеме 25 μ l. ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле с добавлением раствора бромида этидия до конечной концентрации 0,5 μ g/ml при напряжении 100 В. Результаты электрофореза документировали с помощью системы геледокументации Bio-Rad GelDoc 2000.

Хромосомные препараты рапса готовили из корневой меристемы рапса по методике, разработанной ранее для мелкохромосомных видов растений с использованием предобработки интеркалятором ДНК — 9-аминоакридином [19].

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) с зондами 45S и 5S рДНК и DAPI-дифференциальное окрашивание хромосом проводили по описанным ранее методикам [20].

Просмотр хромосомных препаратов, отбор метафазных пластинок и их анализ проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX61, сопряженного с черно-белой ПЗС (прибор с зарядовой связью) камерой

CoolSnap (RoperScientific Inc., США). Анализировали не менее 15 выбранных метафазных пластинок каждого образца с хорошим разбросом хромосом. Полученные изображения хромосом обрабатывали с помощью стандартных компьютерных методик улучшения изображения Adobe Photoshop 10.0 (Adobe Systems Inc., Birmingham, USA). Идентификацию хромосом проводили в соответствии с морфологией хромосом и распределением выявленных хромосомных маркеров [21–24].

Результаты и обсуждение

Для оценки морозоустойчивости генотипов озимого рапса был проведен поиск молекулярных маркеров, позволяющих локализовать гены, отвечающие за эти признаки. В работе Rakic et al. [10] выявлен доминантный SSR-маркер *Bn0110*, тесно сцепленный с одноименным локусом количественной устойчивости. С помощью SSR-маркера *Bn0110* нами проанализирована коллекция озимых сортов рапса (рис. 1). Установлено, что из 56 образцов в 31 образце присутствует QTL *Bn0110* (размер фрагмента 350 п. н.).

Циркадные ритмы играют критическую роль в регуляции множества физиологических и метаболических процессов у растений. Белок CCA1 (Circadian Clock Associated 1, транс-

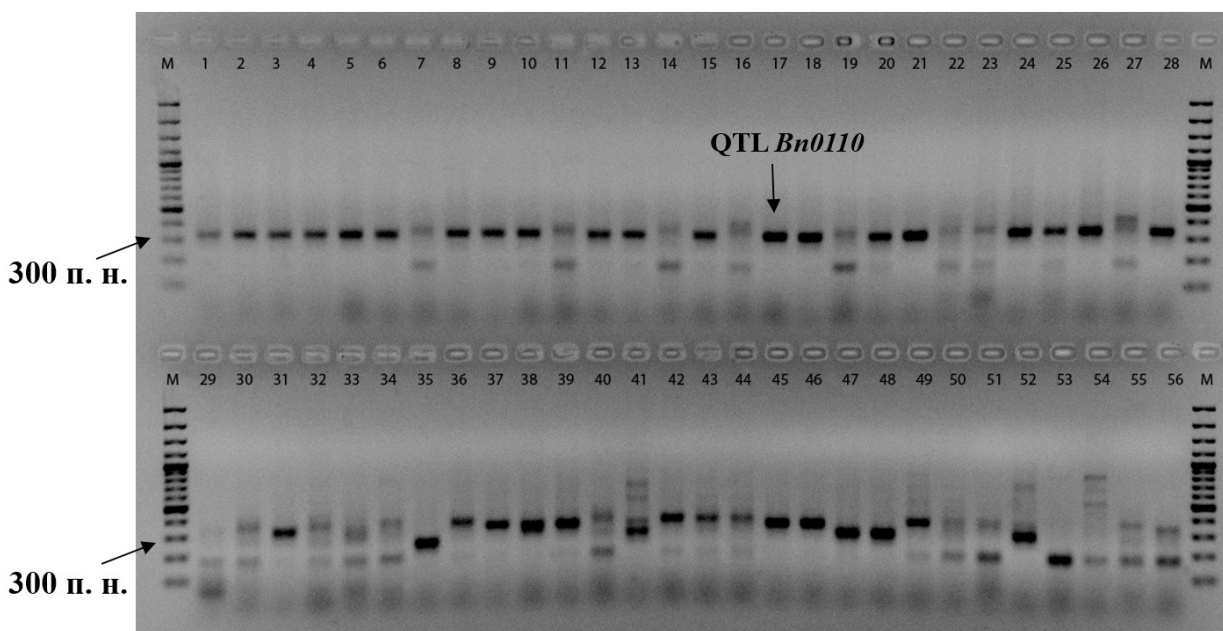


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов амплификации фрагмента *Bn0110* (праймеры Bn0110F и Bn0110R). Дорожки 1–56 — образцы растений рапса; М — маркер молекулярного веса (GeneRuler 100bp Plus, Thermo Fisher Scientific)

крипционный фактор семейства MYB) играет важную роль в фитохром-зависимой индукции фотосинтетических генов и регуляции циркадных ритмов. *CCA1* участвует в позитивной регуляции холодового ответа у растений путем индукции экспрессии *CBF*-генов в условиях низкой температуры [25]. Это повышает вероятность того, что различные аллели гена *CCA1* могут отвечать за различия многих сельскохозяйственных культур в уровне устойчивости к низким температурам.

Song et al. [11] разработали молекулярные маркеры *BoCCA1-1R1* и *BoCCA1-2R1*, позволяющие детектировать наличие делеций и инсерций в двух различных аллелях гена *CCA1* капусты огородной *Brassica oleracea* (*BoCCA1-1* и *BoCCA1-2*), а также продемонстрировали эффективность этих маркеров для дифференциации устойчивых и чувствительных к низким отрицательным температурам генотипов капусты. Поскольку рапс *B. napus* произошел в результате скрещивания сурепицы ($n = 10$, геном *AA*) с капустой ($n = 9$, геном *CC*) и последующего удвоения числа хромосом [26], данные ДНК-маркеры были использованы нами для идентификации морозостойких форм рапса. Установлено, что праймеры, фланкирующие аллель *BoCCA1-1*, позволяют амплифицировать последователь-

ности различных размеров: у устойчивых к холоду сортов рапса — фрагмент размером 1000 п. н., у восприимчивых — 750 п. н. [11].

Верификация коллекции образцов рапса при помощи SCAR-маркера *BoCCA1-1R1* показала, что аллель *BoCCA1-1*, характерный для устойчивых к холоду сортов рапса, содержится в 10 геномах из 56 проанализированных сортов (рис. 2).

SCAR-маркер *BoCCA1-2R1* ассоциирован с аллелем *BoCCA1-2* гена *CCA1*, который вносит вклад в общую устойчивость рапса к низким температурам. Праймеры, фланкирующие последовательность маркера, позволяют амплифицировать фрагмент размером 800 п. н. для восприимчивых образцов. Использование ДНК-маркера *BoCCA1-2R1* позволило детектировать последовательность, определяющую восприимчивость, у 46 из 56 проанализированных образцов (рис. 3), что необходимо учитывать при подборе родительских пар в селекции на морозостойкость.

Проведенный в данной работе анализ кариотипов и DAPI-бэндинг выявил наличие у всех исследуемых сортов рапса характерный для рапса аллополиплоидный кариотип ($2n = 38$), представленный двумя *A*- и *C*-субгеномами с хромосомами размером 3,5–7 мкм. Крупные гетерохроматические DAPI-бэнды расположены

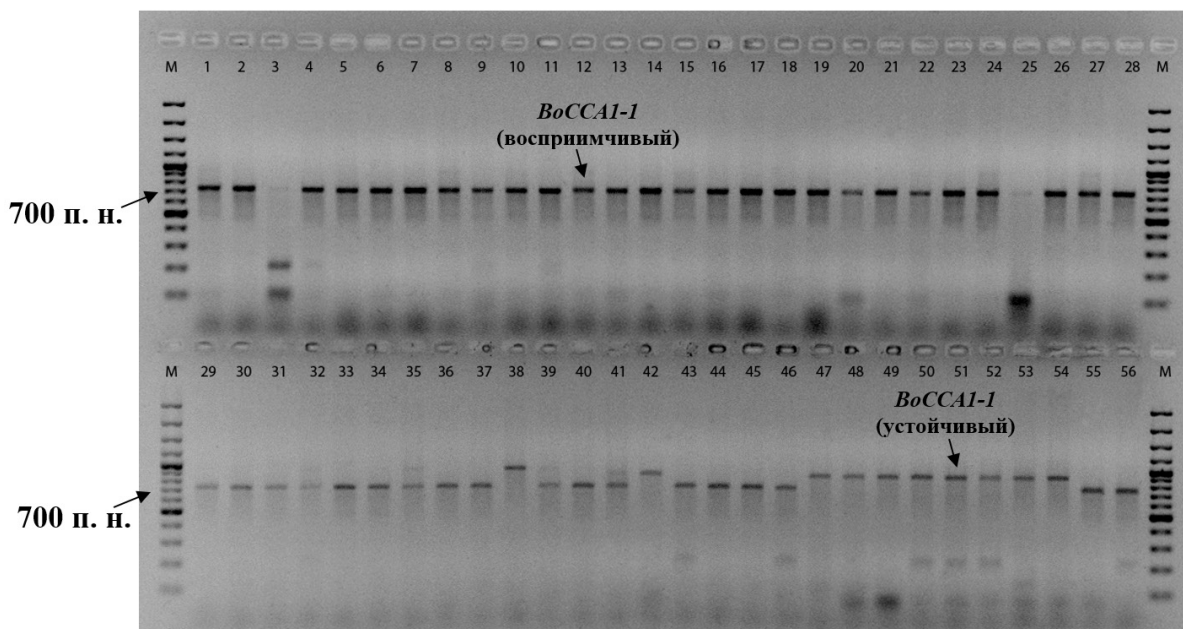


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации фрагмента *BoCCA1-1* (праймеры *BoCCA1-F* и *BoCCA1-1R1*). Дорожки 1–56 — образцы растений рапса; М — маркер молекулярного веса (GeneRuler 100bp Plus, Thermo Fisher Scientific)

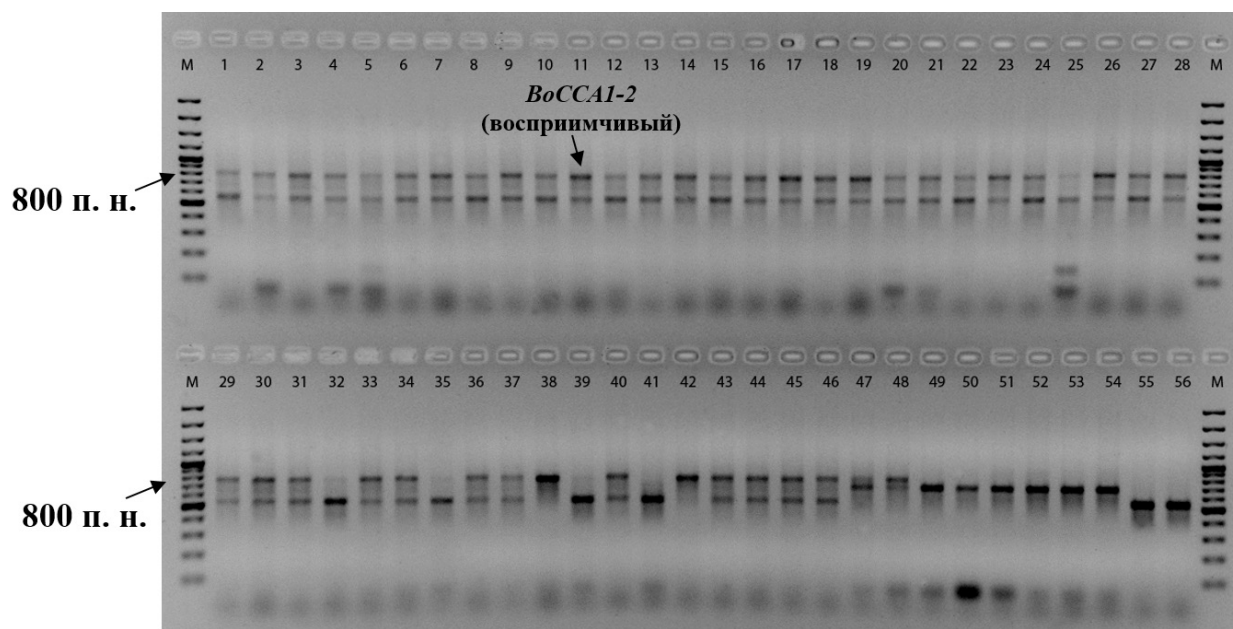


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации фрагмента *BoCCA1-2* (праймеры *BoCCA1-F* и *BoCCA1-2R1*). Дорожки 1–56 — образцы индивидуальных растений рапса; М — маркер молекулярного веса (GeneRuler 100bp Plus, Thermo Fisher Scientific)

в основном в прицентромерных районах хромосом, а средние и небольшие DAPI-бэнды — преимущественно в теломерных и интеркалярных районах хромосом.

В табл. 2 представлены полиморфные варианты хромосом, несущие кластеры рибосомных генов, наблюдаемые у исследуемых сортов рапса. FISH-анализ с зондами 45S и 5S рДНК выявил в кариотипах исследуемых сортов наличие 12–16 сайтов 45S рДНК и 10–14 сигналов 5S рДНК. Кроме того, внутривидовой полиморфизм по размеру локусов 45S и

5S рДНК выявлен на хромосомах 2А, 3А, 4А, 4С и 8С (табл. 2). В кариотипах образцов сорта Северянин наблюдался полиморфизм как по числу 45S рДНК (14–15–16 сайтов), так и по числу 5S рДНК локусов (12–13–14). При этом, в кариотипах выявлены как гомоморфные, так и гетероморфные сочетания гомологов хромосомы 4А (табл. 2).

Полученные результаты согласовываются с описанным ранее для *B. napus* высоким уровнем внутривидового полиморфизма по локализации на хромосомах рДНК сайтов [17, 18, 24].

Таблица 2

Локализация сайтов 45S и 5S рДНК в кариотипах изучаемых сортов рапса

Генотип	Хромосомы А- и С-субгеномов с отдельными 45S рДНК		Хромосомы А- и С-суб-геномов с отдельными 5S рДНК		Хромосомы А- и С-субгеномов с ко-локализованными 45S+5S рДНК				Общее число сигналов 45S/5S рДНК в кариотипе
	7С/8С ЯОР	2А L ПЦ/ПК	10А S CT	4С L ПЦ/МД	1А L ПК	3А L ПК	4А L ПК	5А S ЯОР	
Лауреат	К/К	С/0	С	М/С	К/М	К/К	0/0	К/С	14/12
Горизонт	К/К	С/0	С	С/0	К/М	С/С	0/0	К/С	12/10
Норд	К/К	С/М	С	С/0	К/М	С/С	С/0	К/С	16/12
Северянин	К/К	С/М	С	М/С	К/М	К/К	0/0 С/М	К/С	14-15- 16/12-13-14

Продолжение табл. 2

Генотип	Хромосомы А- и С-субгеномов с отдельными 45S рДНК		Хромосомы А- и С-суб-геномов с отдельными 5S рДНК		Хромосомы А- и С-субгеномов с ко-локализованными 45S+5S рДНК				Общее число сигналов 45S/5S рДНК в кариотипе
	7C/8CS ЯОР	2A L ПЦ/ПК	10A S CT	4C L ПЦ/МД	1A L ПК	3A L ПК	4A L ПК	5A S ЯОР	
Столичный	К/К	С/М	С	С/М	К/М	К/С	0/0	К/С	14/12
Зорны	К/К	С/М	С	С/0	К/М	С/С	С/0	К/С	16/12
Ветразь	К/С	С/0	С	М/С	К/М	С/М	С/М	К/С	14/10

Примечание. Наблюдаемые варианты размеров рДНК сайтов: К — крупный, С — средний, М — мелкий; L ПЦ / ПК / ДС / МД — сайты рДНК, расположенные в прицентроммерном районе / проксимальном районе / медианном районе / дистальном районе длинного плеча хромосомы; S ЯОР / СТ — сайты рДНК, локализованные в районе вторичной перетяжки спутничной хромосомы / субтеломерном районе короткого плеча хромосомы

У наиболее зимостойких сортов российской (Норд и Северянин) и белорусской (Зорны) селекции обнаружено сходство по распределению и размерам выявленных хромосомных маркеров. При этом у сорта Северянин выявлен гетероморфизм гомологов. Эти сорта имеют наиболее широкое районирование, в том числе в районах рискованного земледелия (Красноярский край, РФ), что указывает на его высокие адаптационные свойства.

Заключение

Озимый рапс характеризуется как высокотехнологичная и продуктивная масличная культура. Однако низкие температуры представляют собой один из основных факторов, угрожающих производству рапса. Строгое соблюдение технологии возделывания является одним из решений, позволяющим предотвратить потери культуры при перезимовке. Вторым решением является создание устойчивых к отрицательным температурам сортов озимого рапса. Для этого необходимо идентифицировать морозостойкую зародышевую плазму у выращиваемых на территории Беларуси и России генотипов озимого рапса и использовать ее в селекции современных сортов.

Целью нашего исследования являлась идентификация молекулярных маркеров, ассоциированных с генами, вносящими вклад в морозоустойчивость, а также поиск хромосомных маркеров, ассоциированных с устойчивостью к низким температурам, на основе изучения

внутривидового хромосомного полиморфизма в кариотипах сортов озимого рапса с помощью FISH с зондами 45S и 5S рДНК и DAPI-дифференциального окрашивания, что позволит выявить с помощью спектра маркеров морозоустойчивые сорта рапса для дальнейшего селекционного процесса по данному признаку.

В исследовании использовано три ДНК-маркера (Bn0110, BoCCA1-1R1 и BoCCA1-2R1), которые позволяют детектировать гены, ассоциированные с повышенной и пониженной устойчивостью озимого рапса к низким температурам. С помощью ДНК-маркеров проведено типирование коллекции озимых сортов рапса по генам, определяющим морозоустойчивость. Установлено, что 31 из 56 проанализированных образцов несут QTL Bn0110, ассоциированный с устойчивостью к пониженным температурам. Анализ сортов с помощью молекулярных маркеров, ассоциированных с аллелями генов генома *S. B. napus*, определяющими устойчивость и восприимчивость генотипов к низким температурам, показал, что аллель BoCCA1-1, характерный для устойчивых к холоду генотипов, содержится в геномах 10 из 56 проанализированных образцов. При этом аллель BoCCA1-2R1, характерный для восприимчивых генотипов, присутствует у 46 из 56 образцов, что необходимо учитывать при подборе родительских пар в селекции на морозостойкость.

Проведенный молекулярно-цитогенетический анализ выявил сортовую специфичность

сочетаний полиморфных вариантов разных хромосом в кариотипах озимых сортов рапса. У наиболее зимостойких сортов российской (Норд и Северянин) и белорусской (Зорны) селекции обнаружено сходство по распределению и размерам хромосомных маркеров и идентичность сочетаний полиморфных вариантов гомологичных хромосом, несущих локусы 45S и/или 5S рДНК. Наиболее широкий хромосомный полиморфизм по локализации и размерам локусов 45S и 5S рДНК наблюдается у самых зимостойких сортов озимого рапса, которые широко районированы, в том числе в районах рискованного земледелия (Красноярский край, РФ).

Следует отметить, что в Беларуси и России исследования подобного рода проводятся впервые, и их результаты в перспективе могут использоваться в селекции при получении новых отечественных озимых сортов рапса с повышенной морозостойкостью, что позволит избежать или минимизировать существенные потери урожая во время суровых зим.

Работа выполнена в рамках договора Б18Р-108, подпрограммы «Структурная и функциональная геномика» ГПНИ «Биотехнологии» (Беларусь), а также поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (проект № 18-54-00027 Бел_а).

Список использованных источников

1. Levitt, J. Responses of Plants to Environmental Stress, 2nd Edition, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. / J. Levitt // Responses of Plants to Environmental Stress, 2nd Edition, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. — 1980. — Vol. 1. — P. 28–39.
2. Hale, M.G. The physiology of plants under stress. / M.G. Hale, D.M. Orcutt // The physiology of plants under stress. — 1987. — Vol. 3. — P. 332–340.
3. Amanga, A.O. Prospects for transgenic and molecular breeding for cold tolerance in canola (*Brassica napus* L.). / A.O. Amanga // Oilseeds. — 2012. — P. 108–129.
4. Cook, G. Genetically Modified Language: The Discourse of Arguments for GM Crops and Food. Genetically Modified Language / G. Cook. — Routledge, 2004. — Vol. 12. — P. 581–588.
5. Thomashow, M.F. Plant cold acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms / M.F. Thomashow // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. — 1999. — Vol. 50, № 1. — P. 571–599.
6. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity / B.L. Örvär [et al.] // The Plant Journal. — 2000. — Vol. 23, № 6. — P. 785–794.
7. Chinnusamy, V. Cold stress regulation of gene expression in plants / V. Chinnusamy, J. Zhu, J.-K. Zhu // Trends in Plant Science. — 2007. — Vol. 12, № 10. — P. 444–451.
8. An Overview of Cold Resistance in Plants / L.-J. Chen [et al.] // Journal of Agronomy and Crop Science. — 2014. — Vol. 200, № 4. — P. 237–245.
9. Gilmour, S.J. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana* / S.J. Gilmour, N.N. Artus, M.F. Thomashow // Plant Mol Biol. — 1992. — Vol. 18, № 1. — P. 13–21.
10. Rakic, B. Genetic variability between several *Brassicaceae* populations of different winter survival ability / B. Raki. — P. 3.
11. Allelic variation in *Brassica oleracea* Circadian Clock Associated 1 (BoCCA1) is associated with freezing tolerance / H. Song [et al.] // Hortic. Environ. Biotechnol. — 2018. — Vol. 59, № 3. — P. 423–434.
12. Soltis, D.E. Molecular Data and the Dynamic Nature of Polyploidy / D.E. Soltis, P.S. Soltis, D.L.H. Rieseberg // Critical Reviews in Plant Sciences. — 1993. — Vol. 12, № 3. — P. 243–273.
13. Frequent nonreciprocal translocations in the amphidiploid genome of oilseed rape (*Brassica napus*) / A.G. Sharpe [и др.] // Genome. — 1995. — Vol. 38, № 6. — P. 1112–1121.
14. Snowdon, R.J. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities / R.J. Snowdon, W. Friedt // Plant Breeding. — 2004. — Vol. 123, № 1. — P. 1–8.
15. Plieske, J. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species / J. Plieske, D. Struss // Theor Appl Genet. — 2001. — Vol. 102, № 5. — P. 689–694.
16. Quiros, C.F. Molecular Markers and Their Application to Genetics, Breeding and Evolution of *Brassica* (Utilization of DNA-Marker for Breeding and Classification in Horticultural

Plants, For Further Development of Horticulture in East Asia) / C.F. Quiros // Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. — 1998. — Vol. 67, № 6. — P. 1180–1185.

17. Xiong, Z. Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus* / Z. Xiong, R.T. Gaeta, J.C. Pires // PNAS. — 2011. — Vol. 108, № 19. — P. 7908–7913.

18. Intraspecific chromosomal and genetic polymorphism in *Brassica napus* L. detected by cytogenetic and molecular markers / A.V. Amosova [et al.] // J Genet. — 2014. — Vol. 93, № 1. — P. 133–143.

19. 9-Aminoacridine: An efficient reagent to improve human and plant chromosome banding patterns and to standardize chromosome image analysis / O.V. Muravenko [et al.] // Cytometry Part A. — 2003. — Vol. 51A, № 1. — P. 52–57.

20. Comparison of genomes of eight species of sections *Linum* and *Adenolinum* from the genus *Linum* based on chromosome banding, molecular markers and RAPD analysis / O.V. Muravenko [et al.] // Genetica. — 2009. — Vol. 135, № 2. — P. 245–255.

21. Levan, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes / A. Levan, K. Fredga, A.A. Sandberg // Hereditas. — 1964. — Vol. 52, № 2. — P. 201–220.

22. Integration of the Cytogenetic and Genetic Linkage Maps of *Brassica oleracea* / E.C. Howell [et al.] // Genetics. — 2002. — Vol. 161, № 3. — P. 1225–1234.

23. Karyotype variation and conservation in morphotypes of non-heading Chinese cabbage / J. Zheng [et al.] // Plant Syst Evol. — 2015. — Vol. 301, № 7. — P. 1781–1791.

24. Genomic changes in generations of synthetic rapeseed-like allopolyploid grown under selection / A.V. Amosova [et al.] // Euphytica. — 2017. — Vol. 213, № 9. — P. 217.

25. Green, R.M. Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression / R.M. Green, E.M. Tobin // PNAS. — 1999. — Vol. 96, № 7. — P. 4176–4179.

26. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome / B. Chalhoub [et al.] // Science. — 2014. — Vol. 345, № 6199. — P. 950–953.

G.V. Mozgova¹, N.E. Horuzhiy¹, A.V. Amosova², Ya.E. Pilyuk³, V.M. Belyavsky³, S.Yu. Khrumchenko³,
O.V. Muravenko², V.A. Lemesh¹

GENETIC POLYMORPHISM OF *BRASSICA NAPUS* RELATED TO COLD TOLERANCE

¹Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS
Moscow, 119991, Russia

³Research and Practical Center of the National Academy of Sciences
of the Republic of Belarus for Arable Farming
Zhodino, 222160, the Republic of Belarus

DNA markers (*Bn0110*, *BoCCA1-1R1* and *BoCCA1-2R1*), which allow detecting the loci of the quantitative traits and also alleles of the genes linked both to low and high winter resistance in winter rapeseed, were revealed. The genotypes which were marked according to the genes related to cold tolerance were identified. Out of 56 studied specimens, 31 specimens were found to have QTL *Bn0110* associated with cold tolerance. The analysis of rapeseed varieties with the use of molecular markers associated with the alleles of genes in the *B. napus* C genome and related to cold tolerance and sensibility of genotypes demonstrated that the allele *BoCCA1-1* (specific to cold tolerant genotypes) was revealed in the genomes of 10 out of 56 studied specimens. Besides, *BoCCA1-2R1* (specific to sensitive genotypes) was absent in 46 out of 56 studied specimens. These results should be taken into account when selecting potential parents in breeding for cold tolerance. Molecular cytogenetic analysis indicated the variety-specific combinations of polymorphic variants of different chromosomes in karyotypes of the studied winter *B. napus*. In most winter resistant varieties of Russian (Nord and Severyanin) and Belarusian (Zorny) breeding, the similarity in distribution and sizes of the revealed chromosomal markers, as well as similar combinations of polymorphic variants of homologous chromosomes bearing 45S and 5S rDNA, were detected. All studied varieties are considered to be winter resistant and widely regionalized, including the areas of risk farming (Krasnoyarsk territory). Our findings demonstrated that the most winter resistant varieties of *B. napus* had the highest level of chromosomal polymorphism by the localization and sizes of 45S and 5S rDNA loci.

Key words: *B. napus*, winter resistance, molecular and chromosomal markers.

Дата поступления статьи: 4 февраля 2019 г.

П.С. Кирьянов¹, О.Ю. Баранов¹, А.А. Маслов², А.В. Падутов¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕЖВИДОВЫХ И ВНУТРИВИДОВЫХ ГИБРИДОВ БЕРЕЗ ВОСТОЧНО-ЕВРОПЕЙСКОГО РЕГИОНА

¹Институт леса НАН Беларуси

Республика Беларусь, 246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71

e-mail: PKirjanov@yandex.ru

²Институт лесоведения РАН

Россия, 143030, п/о Успенское, ул. Советская, 21

e-mail: amaslov@ilan.ras.ru

В статье представлены результаты молекулярно-генетических исследований представителей рода *Betula* (Береза), характеризующихся различным таксономическим статусом. Рассмотрены подходы к идентификации межвидовых и внутривидовых гибридов на основе использования SSR- и EST-маркеров. Показано, что наиболее информативным способом диагностики межвидовых гибридов березы повислой и пушистой (*B. pendula* × *pubescens*) является оценка SSR-спектров гетерозиготных растений. Приведены данные об особенностях распределения показателей генетического полиморфизма среди селекционных форм березы повислой (*B. pendula* Roth.) и карельской березы (*B. pendula* Roth. var. *carelica* Mercl.).

Ключевые слова: ДНК-маркирование, EST- и SSR-локусы, гетерозиготность, береза.

Введение

Гибридизация представляет собой процесс объединения генетического материала наследственно различающихся индивидов живых организмов. При этом в процессы гибридизации, протекающие в естественных условиях, могут быть вовлечены как индивиды, относящиеся к популяциям одного вида (внутривидовая гибридизация), так и к разным видам (отдаленная гибридизация) [1].

Гибридизация *sensu lato* является одним из естественных механизмов, обеспечивающих поддержание потока генов между популяциями или видами, и ее действие, согласно основным принципам популяционной генетики, направлено на снижение уровня генетической подделенности и дифференциации внутри или между видами соответственно. В то же время, в случае конкурентного преимущества гибридных индивидов над исходными родительскими формами, характер протекающих процессов в популяциях приобретает явно выраженные черты формирования микроэволюционных изменений и создает предпосылки для последующего видообразования. Согласно исследованиям различных авторов, гибридогенное видообразова-

ние отмечено для значительного числа систематических групп растительных организмов. При этом в особой степени данное явление выражено среди родовых таксонов, характеризующихся наличием полиплоидных рядов [2].

Изучение различных аспектов гибридизации имеет не только важное научное значение для решения широкого спектра вопросов в области филогении, систематики, таксономии, популяционной и молекулярной генетики, но и представляет собой актуальную практическую задачу, направленную на создание, выявление и отбор генотипов с заданными показателями хозяйственно-ценных признаков. Важной методологической составляющей исследования процессов интрогрессии и интерградации, оказывающей значительное влияние на достоверность получаемых результатов, и, в частности, точность определения таксономического статуса гибридного потомства различных поколений, является информативность используемых аналитических подходов, что в свою очередь определяет необходимость постоянного совершенствования методов изучения, включая оптимизацию используемых диагностических признаков и маркеров [3].

Традиционными признаками, используемыми в таксономических исследованиях растительных организмов, являются качественные и количественные морфолого-анатомические характеристики генеративных и вегетативных органов. Несмотря на основополагающую роль морфолого-анатомических признаков в систематике растений, в случае идентификации близкородственных видов данный подход зачастую имеет ряд ограничений, что, как правило, связано с отсутствием дискретных критериев оценки, наличием модификационной изменчивости, а также определенной доли субъективизма при выполнении анализа. Наличие данных проблемных аспектов делает невозможным проведение достоверного анализа гибридного потомства близкородственных видов даже в первом поколении. Для решения указанных спорных вопросов систематики, как правило, используют дополнительные методы исследования, основанные на применении альтернативных диагностических критериев: физиологических, репродуктивных, экологических, биохимических, цитологических, кариологических и др. Однако следует отметить, что все перечисленные подходы не являются универсальными и применимы только по отношению к определенным таксономическим группам. Развитие молекулярно-генетических технологий позволило разработать широкий спектр различных типов ДНК-маркеров, позволяющих проводить комплексные таксономические исследования, включая диагностику гибридных индивидов различного типа. Однако, несмотря на наличие значительного числа преимуществ молекулярно-генетических признаков перед другими типами систематических маркеров, в рамках текущей общепринятой концепции классификации живых организмов основной проблемой задачей является определение исходного эталонного генотипа вида для проведения последующего сравнительного анализа. Среди вариантов решений данного вопроса можно выделить популяционные, геногеографические, палеоботанические аспекты, направленные на установление центров происхождения видов и, соответственно, выбора наиболее типичного референсного генома. Дополнительные подходы, связанные с ранжированием по таксономической значимости тех или иных

участков генома, в настоящее время обсуждаются в литературе широким кругом исследователей, представляющих различные области молекулярной биологии, эволюционного учения и систематики [4].

Береза (*Betula* L.) является одной из распространенных лесообразующих пород на территории Восточно-Европейского региона. Среди полнодревесных форм доминирующее положение занимают береза повислая (*B. pendula* Roth) и береза пушистая (*B. pubescens* Ehrh.). Среди кустарниковых форм можно выделить березу приземистую (*B. humilis* Schrank) и березу карликовую (*B. nana* L.). Широкое хозяйственное и декоративное значение нашли различные представители древесной флоры, отнесенные к роду *Betula*: карельская береза, далекарлийская береза, чернокорая береза, извилистая береза и др. Наличие широкого непрерывного спектра внутри- и межвидовой изменчивости делают березы одним из ценных объектов для изучения процессов интрогрессивной гибридизации и интерградации древесных видов. Среди вопросов, остающихся нерешенными до настоящего времени, наибольшую фундаментальную значимость представляют аспекты естественной гибридизации и филогенетических взаимоотношений березы повислой и пушистой, изучение процессов авто- и аллоплоидизации берез как источника видообразования, выяснение роли гибридогенных факторов в формировании габитуального разнообразия и анатомических особенностей древесины карельской березы и др. С практической точки зрения, особую актуальность представляет направление селекции берез, включая вопросы наследуемости и проявления полигенных признаков в гибридном потомстве, гетерозиса, особенности системы скрещивания и др. [5].

Как отмечалось ранее, окончательное решение данных вопросов является невозможным без применения дополнительных подходов к их изучению, позволяющих получить новые данные и расширить представление о процессах гибридизации видов рода *Betula*. Исходя из всего вышесказанного целью данной работы явилось использование различных молекулярно-генетических подходов для проведения идентификации межвидовых и внутривидовых гибридов берез Восточно-Европейского региона.

Материалы и методы

Экспериментальный материал для проведения молекулярно-генетических исследований берез (Б. повислая, Б. пушистая, Б. карликовая, Б. приземистая, Б. темнокорая и их межвидовые гибриды, вариатеты — карельская береза, далекарлийская береза) был собран в насаждениях естественного и искусственного происхождения, лесных питомниках, а также отобран в ходе работ с коллекциями культур *in vitro* в период 2009–2015 гг. на территории Витебского, Калининковского, Клецкого, Кобринского опытного, Минского, Могилевского, Молодечненского, Пинского, Речицкого, Чечерского специального, Жлобинского лесхозов, а также Двинской и Кореневской экспериментальной лесной базы и коллекции культур *in vitro* Института леса НАН Беларуси и Березинского биосферного заповедника, в испытательных культурах Института аграрных и лесных наук Литвы, на постоянных пробных площадях Института лесоведения РАН (ИЛАН) в Московской области. Всего проанализировано 527 образцов.

Экспериментальный материал представлял собой округлые высечки из листьев ($d \approx 1$ см) как с растений, для которых была проведена предварительная оценка таксономического статуса, так и с образцов с неустановленной видовой принадлежностью.

Выделение ДНК производилось на основании СТАВ-протокола [6]. В ходе исследований были использованы следующие группы ДНК-маркеров: SSR, или микросателлиты (локусы L2.2, L1.10, L7.8, L022, L7.3, L5.4, L3.1) [7], и EST (экспрессируемые локусы ADH, ACT, TUB [8]. Полимеразную цепную реакцию выполняли с использованием коммерческих наборов согласно протоколам фирм-производителей. Секвенирование EST локусов и электрофоретический анализ SSR-маркеров проводили с применением генетического анализатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems) в соответствии с алгоритмами, рекомендуемыми компанией-изготовителем. Нуклеотидная структура секвенированных ампликонов берез анализировалась с помощью сервиса BLAST в GenBank NCBI [9].

Результаты и обсуждение

Основным принципом генетической идентификации гибридов является выявление у изучаемых индивидов промежуточных значе-

ний или одновременного сочетания наследуемых признаков исходных родительских особей. При этом использование большого числа ДНК-маркеров позволяет идентифицировать не только гибриды первого поколения, но и на основании анализа уровня сходства с референсными генотипами определять потомство, образующееся в ходе возвратных скрещиваний. Для анализа процессов интрогрессивной гибридизации в качестве молекулярно-генетических маркеров выступают локусы, изменения в которых сопряжены с последовательностью этапов дивергенции видов. В большинстве случаев генетический полиморфизм ассоциирован со структурными преобразованиями внутри локусов и выражается в форме наличия видоспецифических аллельных вариантов. Таким образом, гибридное потомство от межвидовых скрещиваний будет представлено особями, генотип которых содержит аллели двух разных видов, долевое соотношение которых напрямую определяется таксономическим статусом родительских пар, участвующих в скрещивании. Тем не менее, данный подход может быть реализован только для видов, характеризующихся дискретными молекулярно-генетическими отличиями по ряду ДНК-маркеров.

Как правило, явные генетические различия свойственны видам с аллопатрическим типам ареала, дивергенция которых произошла в хронологически давний период. В то же время изученные виды берез (Б. повислая, Б. пушистая, Б. приземистая и Б. карликовая), произрастающие в Восточно-Европейском регионе, характеризуются наличием симпатрических ареалов, а время их дивергенции, с филогенетической точки зрения, является относительно недавним и не превышает 20 млн лет. Отличительной особенностью Б. пушистой от других видов берез является удвоенный набор хромосом ($4n = 56$), в то время как наиболее типичный кариотип Б. повислой, Б. карликовой и Б. приземистой представлен $2n = 28$ хромосомами. Видообразование Б. повислой, Б. карликовой и Б. приземистой, по литературным данным, происходило путем расхождения группы особей предкового вида по экологическим признакам, а механизмы дивергенции Б. пушистой были основаны на полиплоидизации. При этом если в первом случае изменения накапливались постепен-

но, а сам процесс видообразования был значительно пролонгирован по времени, то во втором случае видообразование происходило сальтационно.

Таким образом, использование аллель-специфического подхода является, на наш взгляд, более информативным по отношению к сравнимым парам Б. повислая – Б. карликовая, Б. повислая – Б. приземистая, Б. карликовая – Б. приземистая, а для анализа гибридного потомства Б. повислая × Б. пушистая, или Б. пушистая × Б. карликовая, Б. пушистая × Б. приземистая преимущество будут иметь подходы, основанные на оценке уровня плоидности, в т. ч. и молекулярно-генетические.

К настоящему времени среди ДНК-маркеров выделяют несколько альтернативных методов, позволяющих производить оценку геномных вариаций и aberrаций. Наиболее распространенным и воспроизводимым способом анализа является генотипирование на основе применения кодоминантных RFLP и SSR (микросателлитных) локусов. Данный подход широко используется в медицине для анализа молекулярно-генетической патологии «Потеря гетерозиготности» (ПГ, или LOH), связанной с делецией фрагмента хромосомы или ее утратой целиком. В качестве RFLP-локусов используются непосредственно фрагменты самих генов (EST), SSR-маркеров — внутренние повторы в генах (EST-SSR), или сцепленные с генами микросателлитные локусы. Преимуществом последнего типа маркеров является значительная разрешающая сила анализа, определяемая высоким уровнем изменчивости. Для анализа микросателлитных локусов на современном этапе используют автоматизированные генетические анализаторы, характеризующиеся высокой чувствительностью детекции исследуемых

молекул ДНК и стандартизированными условиями электрофоретического фракционирования.

Исходя из проведенных ранее кариологических исследований берез было установлено, что Б. повислая является диплоидом, береза пушистая — тетраплоидом, Б. повислая × Б. пушистая — триплоидом. В то же время в ряде случаев, среди переходных морфотипов берез выявляют также диплоидные и тетраплоидные формы, что может быть связано как с различными аномалиями, возникающими при гаметогенезе у исходных родительских особей, так и с наличием генного потока между видами за счет частичного восстановления фертильности у триплоидных гибридов.

В ходе проведенного анализа были изучены микросателлитные спектры образцов берез с различным таксономическим статусом:

Береза повислая. Электрофоретический спектр диплоидных образцов березы повислой был представлен одним или двумя пиками. В случае наличия одного пика проведение анализа плоидности не представлялось возможным, а его генотип обозначался как гомозиготный по данному локусу. Типичный спектр гомозиготного образца представлен на рис. 1 (образец 40-118-9).

В случае гетерозиготных образцов оба пика имели сравнительно одинаковую величину, указывая на равноценность генетического вклада отцовского и материнского деревьев при формировании генотипов потомства. Типичные спектры гетерозиготных образцов березы повислой показаны на рис. 1 (образцы LT136 и ИЛАН19). В то же время в ряде случаев разница в интенсивности сигнала аллелей для некоторых образцов могла достигать 25–30%, что может быть связано как с вариацией коэффициента амплификации для аллельных вариан-

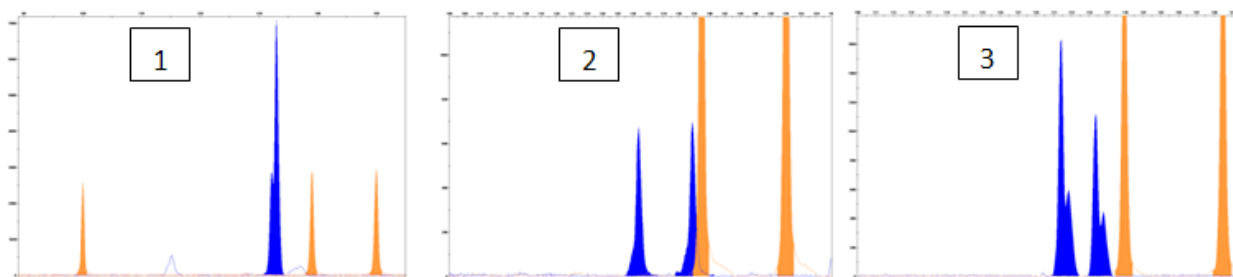


Рис. 1. Микросателлитные спектры березы повислой (диплоидная ткань)

1 — образец 40-118-9, генотип L2.2133/133, 2 — образец LT136, генотип L2.2131/138, 3 — образец ИЛАН19, генотип L2.2131/135

тов с различной первичной структурой (рис. 1, образец ИЛАН19), так и с миксоплоидным характером исследуемых тканей (одновременное наличие клеток с нормальным и гетероплоидным набором хромосом).

Береза пушистая. В ходе анализа образцов с различных деревьев березы пушистой по используемому набору ДНК-маркеров были получены четыре основных варианта электрофоретических спектров, содержащих один, два, три и четыре пика ампликонов. При этом следует отметить, что двуаллельные варианты были отмечены в единичных случаях. Микросателлитные спектры березы пушистой изображены на рис. 2.

Межвидовые гибриды березы повислой и березы пушистой. Микросателлитные профили индивидов гибридного происхождения были представлены тремя основными вариантами: одно-, двух- и трехфракционными спектрами. Электрофореграммы локусов, находящихся в гомозиготном состоянии (рис. 3, образец М1), для проведения оценки таксономического статуса были неинформативны и идентичны результатам, получаемым как для березы повислой, так и для березы пушистой. Наибольшей презентативностью характеризовались генотипы, представленные альтернативными аллельными вариантами

(рис. 3, образец ИЛАН30), что на фореграммах выражалось в виде наличия трех относительно равных по высоте пиков, указывая на триплоидность данных образцов. Однако следует отметить, что среди проанализированных образцов такие варианты генотипов (как в разрезе локусов, так и индивидов) не выявлялись в доминирующем количестве. В случае двухфракционных спектров один из пиков, как правило, в 1,8–2,3 раза превосходил по высоте альтернативный вариант, что связано с двойной дозой содержания данного аллеля в генотипе.

В целом установление гибридного статуса образцов было основано на учете максимального количества выявляемых аллельных вариантов по совокупности анализа семи исследованных локусов. Наличие не более двух вариантов аллелей в локусе одновременно (х, у) соответствовало березе повислой, четырех (х, у, z, q) — березе пушистой, трех аллелей (х, у, z) — межвидовым гибридам. Дополнительным подтверждением таксономического статуса являлась количественная оценка соотношения высоты пиков в различных типах микросателлитных спектров, описание которых было представлено выше. Результаты генотипирования образцов серии ИЛАН представлены в таблице.

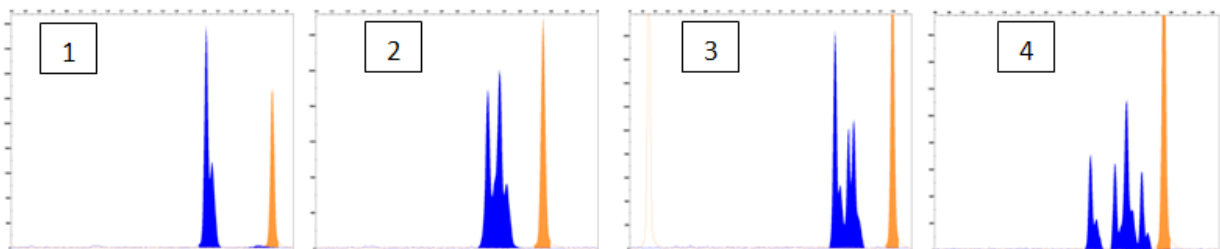


Рис. 2. Микросателлитные спектры березы пушистой (тетраплоидная ткань)

1 — образец М2, генотип L2.2128/128/128/128, 2 — образец К17, генотип L2.2132/132/134/134, 3 — образец К4, генотип L2.2130/130/132/133, 4 — образец К2, генотип L2.2128/132/134/136

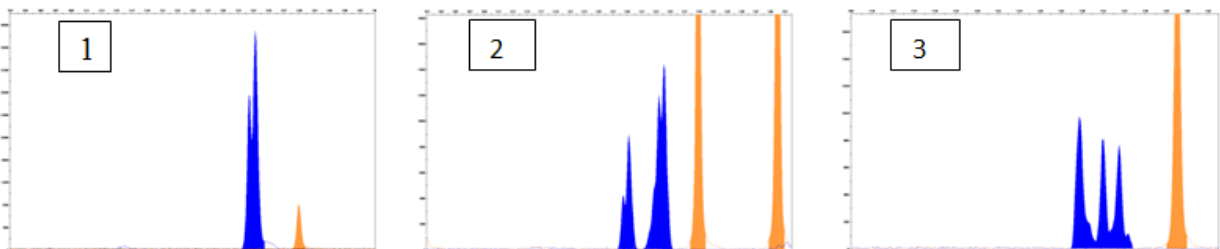


Рис. 3. Микросателлитные спектры межвидовых гибридов березы повислой и березы пушистой (триплоидная ткань)

1 — образец М1, генотип L2.2133/133/133, 2 — образец LT17, генотип L2.2129/134/134, 3 — образец ИЛАН30, генотип L2.2130/132/134

Таблица

Данные о количестве аллельных вариантов, выявляемых в генотипах SSR-локусов образцов берез, и соответствующий им таксономический статус

Образец	L2.2	L5.4	L7.8	L3.1	L7.3	L022	L1.10	Таксономический статус
1	1	2	2	2	1	1	2	<i>Б. повислая</i>
16	2	2	1	2	2	2	1	<i>Б. повислая</i>
17	4	4	3	4	3	4	1	<i>Б. пушистая</i>
30	3	2	3	3	1	3	2	<i>Б. повислая</i> × <i>Б. пушистая</i>
31	4	4	4	4	2	3	4	<i>Б. пушистая</i>
42	2	3	3	3	1	2	3	<i>Б. повислая</i> × <i>Б. пушистая</i>

Спектр выявляемого аллельного разнообразия может также указывать на гибридный характер исследуемых растений. Несмотря на то, что в перекрывающихся частях ареала березы повислой и березы пушистой перечень выявляемых аллельных вариантов и их представленность в популяциях были в целом относительно сходными (рис. 4), ряд алломорфов с частотой встречаемости <10% был специфичен по отношению только к одному из видов. Исходя из этого выявление у отдельных растений березы повислой аллелей, специфичных для березы пушистой, по всей видимости, служит свидетельством генного потока посредством формирования различного типа промежуточных гибридных форм. В то же время наличие явления «гомоплазии» у SSR-локусов, т. е. разнотипность происхождения сходных по размеру и обозначению аллельных вариантов, делает данный подход к оценке гибридогенности не абсолютным с точки зрения его объективности и диагностической точности. Использование менее полиморфных маркеров, например, кодирующих или неповторяющихся последовательностей, с данной точки зрения, является более достоверным критерием при установлении характера происхождения особей. Это связано с тем, что генетическая структура популяций, при использовании умеренно полиморфных маркеров, как правило, характеризуется наличием одного доминирующего по частоте встречаемости аллельного варианта, одного-двух альтернативных вариантов и, в ряде случаев, дополнительных одного-двух редких алло-

морфов. При этом частотные характеристики данных аллельных вариантов применительно к другим систематически близким видам могут отличаться в значительной степени, что является основой для проведения таксономической диагностики на уровне как отдельных индивидов, так и популяций, представляющих различные части видовых ареалов, включая и зоны гибридизации.

Так, например, в ходе секвенирования второго интрона гена, кодирующего фермент алкогольдегидрогеназу, в генотипах ряда образцов березы пушистой, наряду с доминирующим видоспецифическим мотивом — аллель *Adh^{pubescens}*, была выявлена минорная (с долевым участием порядка 25%) последовательность, соответствующая березе повислой — аллель *Adh^{pendula}*, что, по всей видимости, указывает на присутствие в геноме данных растений березы пушистой аллельных вариантов (генома) березы повислой, т. е. их гибридное происхождение (рис. 5).

Кроме анализа процессов потока между симпатрическими видами берез, идентификация гибридного потомства имеет важное практическое значение для проведения селекционного отбора хозяйственно-ценных форм деревьев, получаемых в результате внутривидовых скрещиваний. Среди актуальных задач, связанных с селекцией берез, следует отметить развитие направления ранней диагностики в посадочном материале индивидов с аномальной — «узорчатой» текстурой древесины, определяемых в большинстве случаев как карельская береза — *Betula pendula* Roth var.

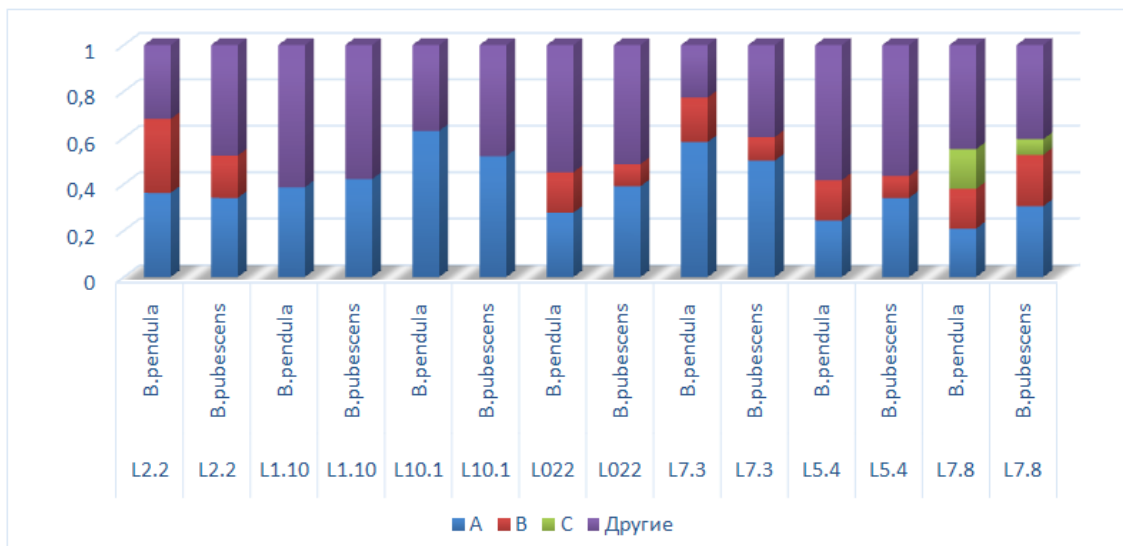


Рис. 4. Частота встречаемости основных для Б. повислой аллельных вариантов у Б. пушистой

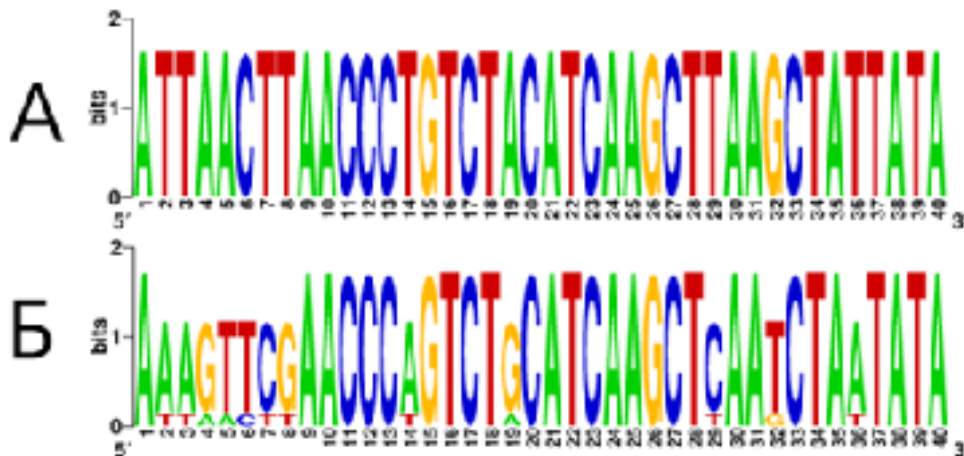


Рис. 5. Нуклеотидная последовательность фрагмента второго интрона Adh гена растений березы повислой (А) и березы пушистой (Б)

carelica (Mercl.) Hämet-Ahti). Необходимость проведения типирования семян карельской березы связана с наследственными особенностями данной породы — расщеплением признаков узорчатости древесины и типа габитуса в семенном потомстве и, как следствие, формированием смешанных (по хозяйственной ценности) групп индивидов в получаемых партиях семян. Наличие постоянного расщепления признаков в семенном потомстве карельской березы указывает на гетерозиготное («гибридное») состояние селективируемых локусов у растений с «узорчатым» фенотипом, что может служить методологической основой (типирование гетерозиготного состояния генов) ранней диагностики форм карельской березы с помощью методов молекулярно-ге-

нетического маркирования. С данной точки зрения, в качестве наиболее информативных ДНК-маркеров могут выступать локусы только с кодоминантным характером проявления аллельных вариантов (SSR, EST, CAP и др), что дает возможность проводить идентификацию гомозиготных и гетерозиготных генотипов.

Так, значимые результаты были получены при анализе генетической структуры форм карельской березы с использованием микросателлитных (SSR) маркеров. Установлено, что наибольшее количество гетерозиготных генотипов (70–72%) приходилось на «узорчатые» растения, отнесенные к высокоствольным и низкоствольным формам, включая, в особенности, и переходные между ними типы габитуса (маркер L2.2.). Наименьшее

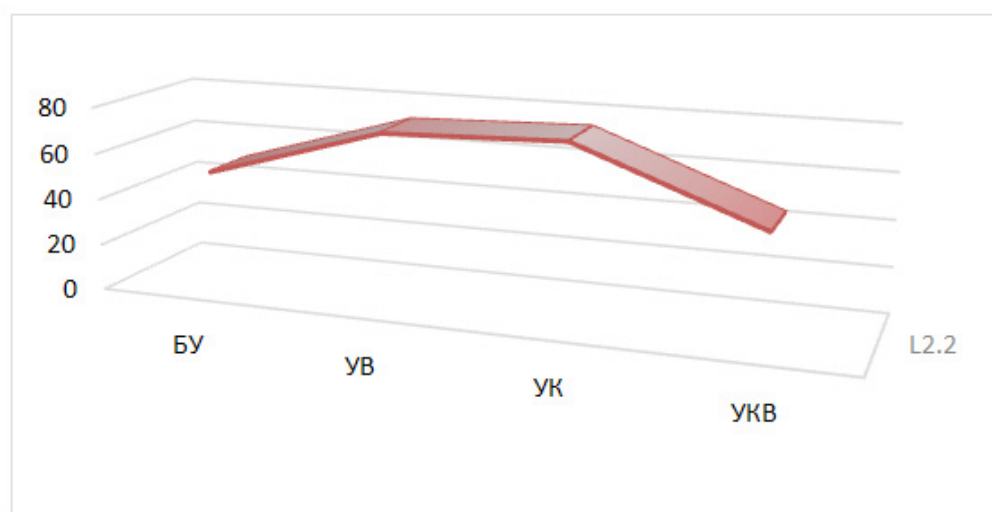


Рис. 6. Распределение значений показателей наблюдаемой гетерозиготности среди форм карельской березы по локусу L2.2

БУ — безузорчатая (полнодревесная) форма, УВ — узорчатая высокоствольная, УК — узорчатая короткоствольная, УКВ — узорчатая кустовидная

число гетерозигот (45–50%) было выявлено в крайних по габитусу формах — безузорчатой (полнодревесной) и узорчатой кустовидной (рис. 6). Следует отметить, что показатели ожидаемой гетерозиготности среди всех форм имели сходные значения — 71–79%.

Отсутствие 100% наблюдаемой гетерозиготности по данному локусу у высокоствольной, короткоствольной и переходной между ними форм может быть объяснено удаленным расположением (и, соответственно, наличием рекомбинации) в хромосоме микросателлитного маркера от генов, детерминирующих габитуальные признаки, а также их полигенным наследованием анализируемого признака.

Анализ степени генетической дифференциации среди форм карельской березы выявил наличие градиентного ряда в соответствии с изменением габитуса — от полнодревесных форм к кустарникам: безузорчатая (полнодревесная) форма → узорчатая высокоствольная форма → узорчатая короткоствольная форма

→ узорчатая кустовидная форма (рис. 7), что также можно использовать в качестве диагностического критерия при проведении селекционных мероприятий.

Гибридный характер генотипов может выступать не только в качестве критерия, определяющего формирование морфолого-анатомических аномалий, но и являться отражением общего уровня фенотипического разнообразия, включая степень адаптационного потенциала вида. Экологическая пластичность фенотипических признаков в последнее время рассматривается в качестве одного из актуальных направлений в лесной селекции, что связано как с оценкой влияния отдельных абиотических факторов на степень реализации генетической информации индивидов, так и с изучением адаптационного потенциала растений в условиях изменяющегося климата, интенсификации процессов природопользования, увеличения числа инвазивных видов патогенов и вредителей. Проведенный анализ полусибсового потомства



Рис. 7. Схематическое изображение структуры дендрограммы, иллюстрирующей степень генетической дифференциации среди форм березы карельской по данным SSR-анализа

БУ — безузорчатая (полнодревесная) форма, УВ — узорчатая высокоствольная, УК — узорчатая короткоствольная, УКВ — узорчатая кустовидная

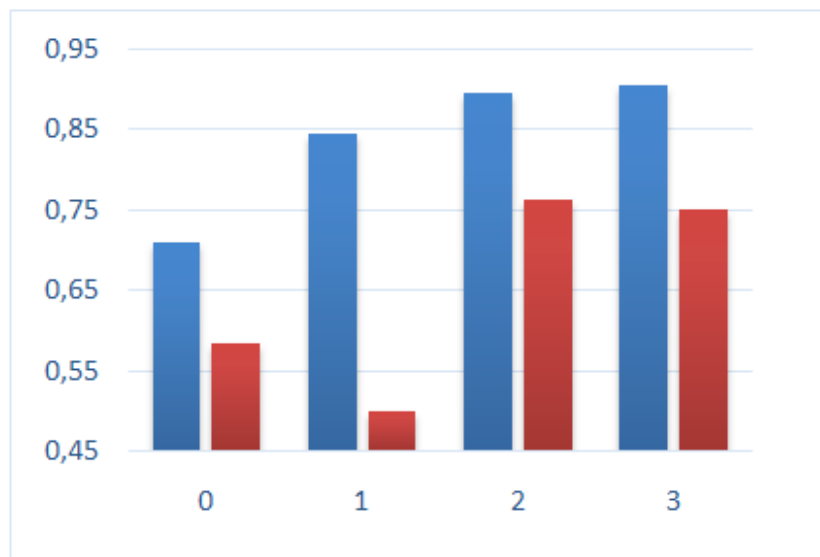


Рис. 8. Распределение значений параметра наблюдаемой гетерозиготности среди групп семей березы повислой, различающихся уровнем пластичности по локусам L5.4 и L2.2
0 — отсутствие пластичности, 1 — пластичность по 1 признаку, 2 — пластичность по 2 признакам, 3 — пластичность по 3 признакам

березы повислой показал, что по ряду локусов (рис. 8) выявлено соответствие увеличения значений параметра наблюдаемой гетерозиготности с увеличением степени экологической пластичности полусибсовых семей.

В ходе детального изучения генетической структуры потомства было установлено, что увеличение общего уровня наблюдаемой гетерозиготности обусловлено как более высокими показателями генотипического полиморфизма исходных материнских особей и пыльцевого пула, так и возрастанием параметра генетической дифференциации между генотипами материнских деревьев и «метагенотипом» пыльцевого пула.

Заключение

Проведенный анализ SSR-спектров деревьев в насаждениях, сформированных с участием березы повислой и березы пушистой, показал наличие трех основных вариантов генотипов, содержащих одновременно два (Б. повислая), четыре (Б. пушистая) и три (Б. повислая × Б. пушистая) аллеля в каждом локусе. При этом оценка таксономического статуса производилась на основании совокупных результатов анализа нескольких ядерных SSR-локусов, что в значительном числе случаев было связано с одновременным наличием одинаковых аллель-

ных вариантов в генотипе, затрудняющих достоверную интерпретацию полученных молекулярно-генетических данных. Альтернативным способом диагностики межвидовых гибридов Б. повислой и Б. пушистой в зоне их совместного произрастания является учет гетерозиготных (по видоспецифичным аллелям) генотипов при анализе «генов домашнего хозяйства» и, в частности, алкогольдегидрогеназы. Данный подход является эффективным и в случае диагностики результатов попарного скрещивания Б. пушистой, Б. приземистой и Б. карликовой.

Наиболее информативным способом идентификации гибридных особей на внутривидовом уровне является использование в качестве генетических маркеров высоковариабельных локусов, например, микросателлитных последовательностей, что связано с высокой вероятностью выявления в выборке гетерозиготных генотипов. Данный подход является наиболее востребованным при проведении направленных скрещиваний в ходе реализации различных селекционных мероприятий. Так, проведенное изучение коллекционных культур карельской березы выявило закономерности формирования типа габитуса и признака узорчатости древесины от степени гетерозиготности и частоты встречаемости основных аллельных вариантов по ряду SSR-локусов. Перспективным направ-

лением, с точки зрения молекулярно-генетической диагностики, является изучение явления экологической пластичности фенотипических признаков, что позволит разработать ряд новых стратегических направлений в плюсовой селекции лесных древесных пород.

Список использованных источников

1. Инге-Вечтомов, С.Г. Генетика с основами селекции: Учеб. для биол. спец. унтов / С.Г. Инге-Вечтомов. — М.: Высш. шк., 1989. — 591 с.
2. Алтухов, Ю. П. Генетические процессы в популяциях / Ю. П. Алтухов. — М.: Наука, 1989. — 328 с.
3. Марков, М.В. Популяционная биология растений / М.В. Марков. — М.: КМК, 2012 г. — 387 с.
4. Санников, С.Н. Очерки по теории лесной популяционной биологии / С.Н. Санников, Н.С. Санникова, И.В. Петрова. — Екатеринбург: РИО Уро РАН, 2012. — 270 с.
5. Гроздова, Н.Б. Береза / Н.Б. Гроздова. — М.: Лесная промышленность, 1979. — 81 с.
6. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. — Мн.: Юнипол, 2007. — 176 с.
7. Gürcan, K, Mehlenbacher, S.A. Transferability of microsatellite markers in the Betulaceae / K. Gürcan, S.A. Mehlenbacher // Journal of the American Society for Horticultural Science. — 2010. — Vol. 135, № 2 — P. 159–173.
8. Phylogenetic relationships of Betula species (Betulaceae) based on nuclear ADH and chloroplast matK sequences Jarvinen, Pia [et al.]. — 2004. — Vol. 91, № 11. — P. 1834–1845.
9. Basic local alignment search tool (BLAST NCBI) [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. — Дата доступа: 21.01.2019.
10. Маслов, А.А., Баранов, О.Ю., Сирин, А.А. Идентификация видов берез в заболоченных лесах Центра Русской равнины по результатам молекулярно-генетического анализа // Лесоведение. — 2019. — № 3. — С. 177–187

P.S. Kiryanov¹, O.Yu. Baranov¹, A.A. Maslov², A.V. Padutov¹

MOLECULAR-GENETIC APPROACHES TO THE IDENTIFICATION OF INTER- AND INTRASPECIES BIRCH HYBRIDS OF THE EASTERN EUROPEAN REGION

¹Forest Research Institute of NASB
Gomel, 246001, the Republic of Belarus

²Institute of Forestry, RAS
Uspenskoye, 143030, Russia

The Article presents the results of molecular-genetic studies of *Betula* (birch) individuals characterized by different taxonomic status. Approaches to the identification of inter- and intraspecies hybrids based on the use of SSR and EST markers are considered. It has been shown that the most informative method for the identification of interspecies silver and downy birch hybrids (*B. pendula* × *pubescens*) is to estimate the SSR spectra of heterozygous plants. The features of genetic polymorphism parameters among breeding forms of silver birch (*B. pendula* Roth.) and curly birch (*B. pendula* Roth. var. *carelica* Mercl.) are presented.

Key words: DNA markers, EST and SSR loci, heterozygosity, birch.

Дата поступления статьи: 24 января 2019 г.

О.А. Разумова, Л.В. Можаровская, С.В. Пантелеев, О.Ю. Баранов

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОСИНТАЗ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

Институт леса НАН Беларуси
Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71
e-mail: o-kovalevicch@mail.ru

С использованием высокопроизводительного секвенирования транскриптомов сосны обыкновенной идентифицировано пять генов, детерминирующих полипептиды с целлюлозосинтазной активностью. На основании полученных результатов проведена аннотация и структурно-функциональный анализ выявленных EST-маркеров. Проведенный сравнительный анализ идентифицированных паралогичных генов выявил высокий уровень сходства их организации.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, высокопроизводительное секвенирование, целлюлозосинтаза, генетический полиморфизм.

Введение

Целлюлоза является одним из основных компонентов клеточной стенки большинства тканей растительных организмов. По химической структуре представляет собой биополимер — полисахарид, образованный остатками D-глюкозы, соединенными $\beta(1 \rightarrow 4)$ -гликозидной связью, что отличает ее от крахмала и гликогена, для которых характерно наличие соединений $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -типа. Данная особенность и определяет вытянутую стержневую конформацию макромолекулы целлюлозы, в отличие от спиралевидных структур, отмечаемых для амилозы крахмала [1-2].

Целлюлоза имеет важное экономическое значение, представляя собой исходное сырье для последующей химической модификации, синтеза или гидролиза, а также являющееся составным компонентом различных видов волокнистых материалов. В настоящее время основными источниками для промышленного получения целлюлозы являются хлопок и древесная масса. При этом, по отношению к древесным растениям, важное технологическое значение (как для процесса получения, так и технических свойств целлюлозы) имеет видовая принадлежность источника сырья. Так, различные древесные породы отличаются не только по содержанию целлюлозы в древесине, но и по степени ее полимеризации, длине и структуре полимерных фибрилл [2].

Биогенез целлюлозных волокон основан на формировании высокоупорядоченных структур (кристаллитов), представляющих собой совокупность плотноупакованных параллельно расположенных полимерных цепей. В образовании кристаллитов главная роль отводится ферментам — целлюлозосинтазам, осуществляющим формирование микрофибрилл целлюлозы. Как правило, целлюлозосинтазы собраны в единый синтезирующий комплекс (розетку), состоящий по современным представлениям из 18–36 отдельных ферментных единиц и производящий одновременную полимеризацию 18–36 глюконовых цепей [3]. В то же время для разных древесных пород состав и структура синтезирующего комплекса может варьировать в определенной степени, что в свою очередь выражается в видоспецифичности строения целлюлозного волокна. Кроме того, для большинства древесных растений выявлены и онтогенетические особенности образования структуры целлюлозных фибрилл, что обусловлено дифференциальной экспрессией генов, кодирующих целлюлозосинтазы на разных стадиях формирования тканей и органов индивидов. Наиболее типичным примером являются различия в организации целлюлозных волокон при биогенезе первичной и вторичной клеточной стенки.

Сложный полигенный характер наследственной детерминации процессов биосинтеза целлюлозы является результатом эволюционных

преобразований, обеспечивающих более высокий уровень морфофизиологической организации растительных организмов и направленных на повышение адаптационного потенциала биологических видов [1, 4].

Таким образом, совокупность локусов, детерминирующих процессы биосинтеза целлюлозы, особенности их первичной структуры и характер экспрессии являются одним из ключевых факторов, определяющих физико-химические свойства и техническое качество целлюлозного волокна. К настоящему времени гены, кодирующие целлюлозосинтазы (*CesA*), описаны более чем для 170 видов растений, среди которых наибольшую изученность получил *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., геном которого содержит 10 генов целлюлозосинтаз (*CesA*) и 30 целлюлозосинтаза-подобных генов (*Csl*). Для древесных растений наследственные аспекты биосинтеза целлюлозы детально рассмотрены у различных видов тополей, сосны ладанной, ели сизой. Что касается сосны обыкновенной, то исследования в данной области проведены лишь частично, а полученные результаты являются разноплановыми и фрагментарными [4].

Исходя из вышесказанного, цель данной работы — идентификация генов целлюлозосинтазы в транскриптоме сосны обыкновенной и проведение их сравнительного анализа.

Материалы и методы

Объектом для проведения исследований являлись как взрослые деревья (фрагменты одревесневших вегетирующих побегов), так и ювенильные растения (проростки) сосны обыкновенной. Общее число образцов тканей взрослых растений составило шесть шт., проростков — восемь шт. Выделение тотальной РНК из растительных тканей проводили с применением набора GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по методике фирмы-производителя. Очистку РНК от примесей геномной ДНК выполняли набором DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific, США), а для ингибирования рибонуклеаз использовали RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, США). Для реакции обратной транскрипции матричной РНК с получением двухцепочечной кДНК использовали набор Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Создание библиотек кДНК (размер фрагмента ≈ 200 п. н.) проводили с использованием набора Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Эмульсионную ПЦР выполняли с применением набора Ion PGM Template OT2 200 Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции компании-производителя в планшетном амплификаторе Ion One Touch 2 System (Thermo Fisher Scientific, США). Этап обогащения микросфер производился с использованием автоматической пробоподготовки Ion One Touch ES с применением наборов Ion PGM Template OT2 Solutions 200 Kit и Ion PGM Enrichment Beads (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию секвенирования выполняли на базе геномного анализатора Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific, США) с применением набора Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 и полупроводникового микрочипа Ion 314 Chip v2 (Thermo Fisher Scientific, США). Первоначальную обработку данных, поступающих от геномного анализатора, осуществляли в автоматическом режиме при помощи программного обеспечения IonTorrent Suite v. 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Окончательную обработку информации и сборку транскриптов генов производили с использованием программного обеспечения SeqMan NGen v. 11 (DNASTAR, Израиль).

Для идентификации кодирующих последовательностей целлюлозосинтаз использовали референсные последовательности *CesA*- и *Csl*-локусов *Pinus taeda* L., размещенных в базе данных нуклеотидных последовательностей GenBank NCBI. Трансляцию нуклеотидных последовательностей с последующим множественным выравниванием проводили в программном пакете CLC Sequence Viewer 6.3 (Qiagen, США). Вторичная структура белковых молекул устанавливалась с использованием программы Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>), 3D-моделирование проводилось на сервере программы SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Результаты и обсуждение

На основе сборки нуклеотидных последовательностей, полученных в ходе секвенирования транскриптома *P. sylvestris* были идентифицированы транскрипты трех генов

CesA-суперсемейства: *CesA1* — ген, кодирующий целлюлозосинтазу 1 (99% сходство с депонентом GenBank AY789650.1 (*CesA1 P. taeda*); *CesA2* — ген, кодирующий целлюлозосинтазу 2 (99% сходство с депонентом GenBank AY789651.1 (*CesA2 P. taeda*); *CesA3* — ген, кодирующий целлюлозосинтазу 3 (99% сходство с депонентом GenBank AY789652.1 (*CesA3 P. taeda*).

С использованием онлайн-сервиса поиска консервативных функциональных доменов CD-Search NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), в транскрируемых последовательностях идентифицированных транскриптов было изучено расположение функциональных доменов. На основании результатов сравнительного анализа установлено, что структурно-функциональная организация CESA1, CESA2 и CESA3 сосны обыкновенной является сходной и совпадает с описанными аналогами для других растительных организмов.

В N-концевой области полипептида идентифицирован цинк-связывающий консервативный домен RING («цинковый палец») подкласса HC. Детальное описание RING-домена приведено в работе П. Косарева с соавторами на примере целлюлозосинтазы A (CESA) *Arabidopsis thaliana* [5]. Согласно литературным данным, данный домен участвует в процессе сборки и стабилизации каталитического комплекса («розетки») целлюлозосинтаз [5–7]. Проведенное изучение домена RING показало, что среди идентифицированных целлюлозосинтаз (CESA1, CESA2, CESA3) сосны обыкновенной основные отличия были связаны с наличием, а также количественным содержанием аминокислотных остатков цистеина (C) и гистидина (H), необходимых для связывания ионов цинка и определяющих формирование третичной структуры. Так, для цинк-связывающего домена пептида CESA1 была

установлена следующая C/H конфигурация — 3(C)H5(C)HC, для CESA2 и CESA3 — 2(C)H7(C) и 8(C) соответственно.

Для цинк-связывающего консервативного домена RING *CesA* сосны обыкновенной (*in silico*) была установлена вторичная структура (рис. 1) и проведено 3D-моделирование (рис. 2). Как видно из рис. 1, вторичная структура домена RING характеризовалась наличием одной α -спирали и двух β -цепей.

Построение 3D-модели проводилось на основе структурного шаблона домена RING каталитической субъединицы IRX3 целлюлозосинтазы *Arabidopsis thaliana* (SMTL ID: 1weo.1), полученной методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса Н. Тейлором с соавторами (рис. 2) [8–9].

На рис. 2 темным цветом выделены остатки цистеина, отмечены α -спирали (α), β -цепи (β -1, β -2), а также Zn-связывающий сайт (Zn). Также указано направление аминокислотной последовательности домена от N- к С-концу. Как следует из результатов анализа полученных трехмерных моделей доменов RING, наблюдается относительное сходство структуры пространственной конформации и расположения α -спиралей, β -цепей и аминокислотных остатков цистеина. В то же время в ходе моделирования *in silico* для CESA1 не был выявлен Zn-связывающий сайт, идентифицированный у CESA2 и CESA3, что, по всей видимости, связано с ограниченными возможностями алгоритмов поиска функциональных центров в случае полиморфных последовательностей.

Дальнейший анализ структурно-функциональной организации CESA сосны обыкновенной позволил идентифицировать основной каталитический домен, примыкающий к RING-области. Детальное изучение каталитического региона показало, что он состоит из нескольких субдоменов, порядок расположения которых для изученных CESA1,



Рис. 1. Схема вторичной структуры домена RING *CesA* сосны обыкновенной

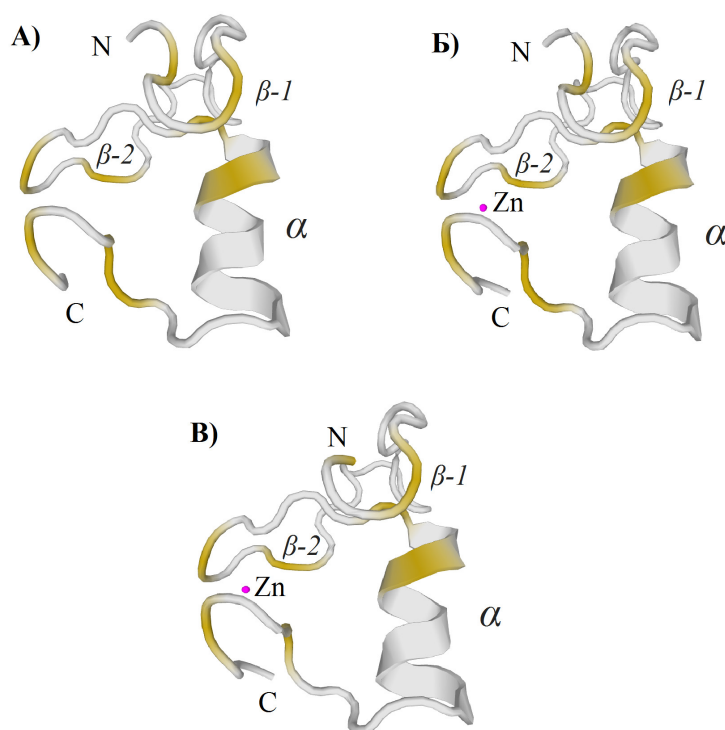


Рис. 2. 3D-модель доменов RING CesA1 (А), CesA2 (Б), CesA3 (В) сосны обыкновенной

CESA2 и CESA3 сосны обыкновенной был идентичным. Так, в начале каталитического домена был расположен гипервариабельный регион (HVR1), обозначаемый также как класс-специфический регион (CSR1). Согласно литературным данным, первичная структура CSR1-региона является сходной среди ортологичных целлюлозосинтаз, относящихся к определенному классу (типу), но существенно отличается среди паралогичных локусов CESA, даже в пределах одного вида растений [4, 10–14]. Как и ожидалось, проведенное сопоставление аминокислотных последовательностей CSR1-региона CESA1, CESA2 и CESA3 сосны обыкновенной показало высокий уровень различий: выявлено более 95% полиморфных сайтов аминокислотных остатков (рис 3).

Кроме CSR1-субдомена в каталитическом домене CESA был идентифицирован второй гипервариабельный регион HVR2 (CSR2), фланкированный высококонсервативными А и В субдоменами, обозначаемыми как CR1 и CR2. Данная особенность структурной организации каталитического домена позволяет разработать универсальные праймеры для ПЦР-амплификации и анализа HVR2 региона

CesA различных растений [15]. Выявленный уровень различий между первичными структурами HVR2-региона CESA1, CESA2 и CESA3 сосны обыкновенной был ниже (порядка 70% полиморфных сайтов) по сравнению с HVR1. Такое различие в данном регионе может быть объяснено его функциональной значимостью — наличием в HVR2-регионе каталитического центра, определяющего взаимодействие с N-концевым доменом CR1 или RING-регионом, необходимым для формирования специфичной структуры активной молекулы фермента [16]. Так, в участке протяженностью от 9 (CESA3) до 14 (CESA1, CESA2) аминокислотных остатков CSR2-региона, исследуемых целлюлозосинтаз сосны, было выявлено высокое содержание цистеиновых оснований (четыре для CESA3, семь для CESA2 и девять для CESA1), определяющих специфичность конформации третичной структуры белковой молекулы.

В ряде исследований, кроме описанного выше CSR2-региона, функциональная активность целлюлозосинтазы также ассоциирована с четырьмя консервативными мотивами, содержащими аминокислотные остатки D...D...D... и (Q / R) XRW [13, 16–18]. У сосны обыкновенной для CESA1, CESA2 и

CESA3 также было выявлено наличие указанных консервативных мотивов: DD и DCD в CR1-регионе, TED и QVLRW в регионе CR2.

Согласно литературным данным, субдомен CR2 является заключительным регионом макромолекулы целлюлозосинтазы, обращенным в цитозоль клеток растений. Последующая

за ним С-концевая область, содержащая 6-8 α -спиралей, локализована в трансмембранном пространстве и не принимает участие в биосинтезе целлюлозы [16–17].

В результате моделирования общей структуры макромолекул CESA1, CESA2 и CESA3 сосны обыкновенной установлено (рис. 4),

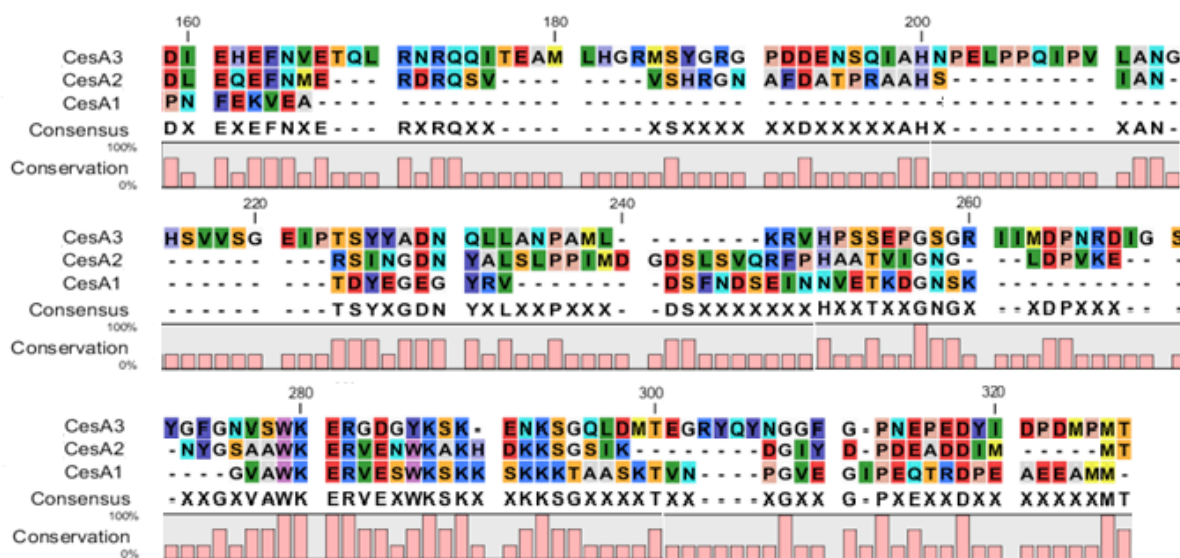


Рис. 3. Сопоставление аминокислотных последовательностей HVR1-региона CesaA1, CesaA2 и CesaA3 сосны обыкновенной

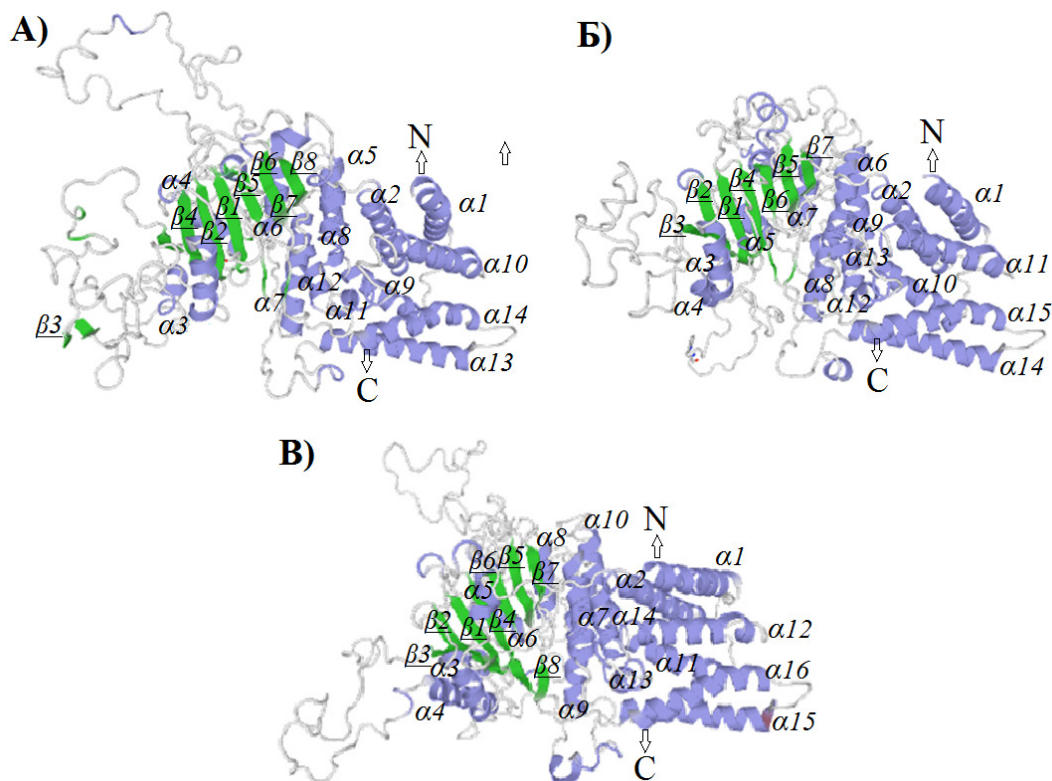


Рис. 4. 3D-модель пространственной структуры CESA1 (А), CESA2 (Б), CESA3 сосны обыкновенной

что они являются в определенной степени консервативными и характеризуются наличием 14-16 α -спиралей (14- α для CESA1; 15- α для CESA2; 16- α для CESA3) и 7 (CESA2)-8 (CESA1, CESA3) β -цепей. Восемь α -спиралей расположены в С-концевой трансмембранной области, что является сходным для большого числа изученных растений. Для семи β -цепей целлюлозосинтаз характерно формирование β -листа смешанной структуры, состоящего из параллельных и антипараллельных цепей. В целом описанная трехмерная модель идентифицированных нами целлюлозосинтаз сосны обыкновенной гомологична модели, полученной *in silico* Л. Сетхафонга с соавторами для CESA1 хлопчатника обыкновенного [12].

Наряду с генами *CesA*-семейства, в транскриптоме сосны обыкновенной идентифицированы два целлюлозосинтаза-подобных гена (*CslA1* и *CslA2*). Проведенный структурно-функциональный анализ CSLA1 и CSLA2 показал, что в отличие от CESA-семейства в составе целлюлозосинтаза-подобных полипептидов отсутствует Zn-связывающий домен. В то же время в аминокислотной последовательности всех CSLA полипептидов, как и в случае CESA идентифицированы D...D...D... и QXXRW-мотивы.

Проведенный сравнительный анализ *CesA* и *CslA* генов среди различных видов хвойных растений показал, что в целом степень генетической дифференциации соответствовала существующей систематике родов *Pinus* и *Picea* (таблица).

Таблица

Степень генетической дифференциации *CesA* и *CslA* генов

№ п/п	Вид	Гены				
		<i>CesA1</i>	<i>CesA2</i>	<i>CesA3</i>	<i>CslA1</i>	<i>CslA2</i>
1	<i>Pinus taeda</i>	99 %	99 %	95 %	98 %	95 %
2	<i>Pinus radiata</i>	95 %	—	98 %	—	—
3	<i>Pinus pinaster</i>	94 %	—	—	—	95 %
4	<i>Pinus chapensis</i>	97 %	87 %	—	—	—
5	<i>Pinus auacahuite</i>	98 %	—	—	—	—
6	<i>Pinus moiieda</i>	96 %	—	—	—	—
7	<i>Pinus strobes</i>	96 %	—	—	—	—
9	<i>Picea glauca</i>	92 %	99 %	88 %	93 %	92 %

Заключение

В результате проведенных исследований в транскриптоме сосны обыкновенной идентифицировано пять генов, ассоциированных с биогенезом целлюлозы: *CesA1*, *CesA2*, *CesA3*, *CslA1* и *CslA2*. Установлено, что гены семейства *CesA* являются паралогами, характеризуются сходной структурно-функциональной организацией, несмотря на высокий уровень различий первичной структуры, выявляемый между некоторыми доменами. Основные отличительные особенности от-

мечались в регионах HVR1 и HVR2. В каталитическом центре CESA1, CESA2 и CESA3 идентифицированы сходные аминокислотные мотивы: DD и DCD (для CR1), TED и QVLRW (для CR2). Различия в структурно-функциональной организации генов *CslA* от *CesA* связаны с отсутствием области, кодирующей Zn-связывающий домен. При этом первичная структура каталитического центра полипептидов CSLA и CESA является сходной, что также указывает на общность их происхождения.

Список использованных источников

1. Титок, В.В., Леонтьев, В.Н., Федоренко, И.В., Кубрак, С.В., Юренкова, С.И., Грушецкая, З.Е. Биосинтез целлюлозы: современный взгляд и концепции // Труды БГТУ. — 2007. — Т. 2, № 1. — С. 54–64.
2. Галиновский, Д.В., Леонтьев, В.Н., Никитинская, Т.В., Райский, А.П., Хотылева, Л.В., Титок, В.В. Идентификация Cesa-генов, экспрессирующихся в стеблях растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) // Доклады НАН Беларуси. — 2010. — Т. 54, № 3. — С. 92–97.
3. Fernandes, A.N., Thomas, L.H., Altaner, C.M., Callow, P., Forsyth, V.T., Apperley, D.C., Kennedy, C.J., Jarvis, M.C. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2011 — Vol.108(47): E1195–203. — P. 1–9.
4. Галиновский, Д.В., Леонтьев, В.Н., Никитинская, Т.В., Райский, А.П., Хотылева, Л.В., Титок, В.В. Молекулярно-генетический анализ целлюлозосинтаз, экспрессирующихся в различных органах растения льна-долгунца // Труды БГТУ. Серия 4: Химия, технология органических веществ и биотехнология. — 2009. — Т. 1, № 4. — С. 178–182.
5. Kosarev, P., Mayer, K.F.X., Hardtke, C.S. Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome // Genome biology. — 2002. — Vol. 3, № 4. — Research0016.
6. Kurek, I., Kawagoe, Y., Jacob-Wilk, D., Doblin, M., Delmer, D. Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-binding domains // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2002. — Vol. 99, № 17. — P. 11109–11114.
7. Ma, K., Xiao, J., Li, X., Zhang, Q., Lian, X. Sequence and expression analysis of the C3HC4-type RING finger gene family in rice // Gene. — 2009. — Vol. 444, № 1. — P. 33–45.
8. Taylor, N.G., Laurie, S., Turner, S.R. Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis* // The plant cell. — 2000. — Vol. 12, № 12. — P. 2529–2539.
9. Taylor, N.G. Identification of cellulose synthase AtCesA7 (IRX3) *in vivo* phosphorylation sites — a potential role in regulating protein degradation // Plant molecular biology. — 2007. — Vol. 64, № 1–2. — P. 161–171.
10. Liang, X., Joshi, C.P. Molecular cloning of ten distinct hypervariable regions from the cellulose synthase gene superfamily in aspen trees // Tree physiology. — 2004. — Vol. 24, № 5. — P. 543–550.
11. Ranik, M., Myburg, A.A. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis // Tree physiology. — 2006. — Vol. 26, № 5. — P. 545–556.
12. Sethaphong, L., Haigler, C.H., Kubic, J.D., Zimmer, J., Bonetta, D., DeBolt, S., Yingling, Y. G. Tertiary model of a plant cellulose synthase // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2013. — Vol. 110, № 18. — P. 7512–7517.
13. Pear, J.R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W.E., Delmer, D.P., Stalker, D.M. Higher plants contain homologs of the bacterial *CelA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1996. — Vol. 93, № 22. — P. 12637–12642.
14. Doblin, M.S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D., Delmer, D.P. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes // Plant and cell physiology. — 2002. — Vol. 43, № 12. — P. 1407–1420.
15. Грушецкая, З.Е., Титок, В.В., Леонтьев, В.Н., Галиновский, Д.В., Лемеш, В.А. Молекулярно-генетическая структура генов их роль в формировании клеточных стенок растений // Труды БГТУ. Серия 4: Химия, технология органических веществ и биотехнология. — 2008. — Т. 1, № 4. — С. 158–160.
16. Scavuzzo-Duggan, T. Functional analysis of the cellulose synthase class specific region in *Physcomitrella patens*. — 2014. — 50 p.
17. Morgan, J.L. W., Strumillo, J., Zimmer, J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation // Nature. — 2013. — Vol. 493, № 7431. — P. 181.
18. Krauskopf, E., Harris, P.J., Putterill, J. The cellulose synthase gene *PrCESA10* is involved in cellulose biosynthesis in developing tracheids of the gymnosperm *Pinus radiata* // Gene. — 2005. — Vol. 350, № 2. — P. 107–116.

O.A. Razumova, L.V. Mozharovskaya, S.V. Panteleev, O.Yu. Baranov

IDENTIFICATION AND COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CELLULOSE SYNTHASE GENES OF SCOTS PINE

Institute of Forest of NASB
Gomel, 246050, the Republic of Belarus

Using high-throughput sequencing of Scots pine transcriptomes, five genes that determine polypeptides with the cellulose synthase activity were identified. Based on the obtained results, an annotation and structural-functional analysis of identified EST markers was performed. A comparative analysis of identified paralogic genes revealed a high level of similarity in their organization.

Key words: Scotch pine, next-generation sequencing, cellulose synthase, genetic polymorphism.

Дата поступления статьи: 1 февраля 2019 г.

Н.В. Воронова, С.С. Левыкина, Ю.В. Бондаренко, Р.С. Шулинский

НЕКОДИРУЮЩИЕ ОБЛАСТИ В МИТОХОНДРИАЛЬНОМ ГЕНОМЕ
ТЛИ *APHIS FABAE MORDVILKOEI* BÖRNER & JANISCH, 1922Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр-т Независимости, 4
e-mail: nvoronova@bsu.by

В работе приведены результаты анализа некодирующих областей митохондриального генома *Aphis fabae mordvilkoie*. Показано, что control-регион несет короткий повтор в 5' области, соответствующий последовательности ДНК-шпильки, характерной для области D-петли. Регион, обычно называемый repeat-регионом, у *A. fabae mordvilkoie* не несет tandemных повторов длиной больше, чем 14 п. н. В митогеноме *A. fabae mordvilkoie* обнаруживается 10 изоформ тРНК, причем 6 из них способны образовывать структуру клеверного листа, а 3 из этих 6 — обладают антикодонами, которые не представлены в тРНК митохондриального генома этого вида тли.

Ключевые слова: тли, митохондриальный геном, *Aphis fabae mordvilkoie*, изоформы тРНК, D-петля, repeat-регион.

Введение

Митохондриальный геном у животных представляет собой довольно консервативную структуру, что делает его источником «удобных» и информативных молекулярных маркеров для филогенетических исследований, идентификации видов, а также исследований, связанных с изучением молекулярной эволюции таксонов [1]. У насекомых митохондриальный геном всегда несет 13 белок-кодирующих генов — это гены трех первых субъединиц цитохром с-оксидазы, цитохрома *b*, двух субъединиц АТФ-синтазы (6 и 8) и семи субъединиц НАДН-дегидрогеназы (1, 2, 3, 4, 4L, 5 и 6). Кроме белок-кодирующих генов, в митогеноме насекомых всегда содержатся 2 гена рибосомальных РНК (по одному для РНК легкой и тяжелой субъединиц митохондриальной рибосомы) и, как правило, 22 гена митохондриальных тРНК, причем перечень кодируемых митохондриальным геном тРНК обычно также довольно консервативен [2]. Кроме генов, в митогеноме насекомых всегда обнаруживаются более или менее протяженные некодирующие области. Интроны в генах митохондрий животных отсутствуют, но митохондриальная ДНК обычно содержит межгенные спейсеры, не несущие какой-либо дополнительной функции, и регион, называемый control-регионом, или D-петлей. Этот участок генома митохондрии обеспечивает начало процесса репликации и обычно

содержит наиболее вариабельные области митохондриальной ДНК как по нуклеотидному составу, так и по длине [3].

Митохондрии настоящих тлей (Aphidoidea) обладают типичным для насекомых геномом за одним исключением — в митохондриальной ДНК тлей и некоторых других Hemiptera обнаруживается крупный некодирующий участок, часто несущий длинные, более 100 нуклеотидов в длину, tandemные повторы (repeat-регион) [4]. Происхождение и функция этого участка генома до сих пор не известны. Интересно, что кроме региона, содержащего повторы, и control-региона, митохондриальный геном тлей очень компактен и почти не содержит некодирующих участков. Межгенные спейсеры в митогеноме тлей обычно короткие — 5–10, редко больше, нуклеотидов в длину, а между некоторыми генами межгенные спейсеры не только отсутствуют, но, более того, гены могут значительно перекрываться, причем если в белок-кодирующих генах такое перекрытие составляет 1–2 нуклеотида, что связано с наличием рамки считывания, то гены тРНК в ряде случаев захватывают 15–20 нуклеотидов белок-кодирующей последовательности [5]. В этом смысле наличие в митохондриальном геноме тлей длинного участка, не несущего гены и не имеющего какого-либо ясного назначения, кажется довольно любопытной особенностью [6].

Некоторые авторы высказывали мнение, что наличие repeat-региона в митохондриальном геноме является специфическим признаком именно тлей, что позволяет предположить, что его появление в митогеноме предкового для современных тлей насекомого произошло не менее, чем 250 млн лет назад [7]. Однако с увеличением числа расшифрованных митохондриальных геномов тлей оказалось, что, во-первых, не все митогеномы тлей содержат repeat-регион, а во-вторых, внутренняя структура repeat-регионов настолько разнообразна, что сложно предполагать, что они являются ортологами [8]. С другой стороны, поскольку даже при отсутствии внутренних tandemных повторов все расшифрованные на сегодняшний день митохондриальные геномы тлей несут более или менее длинный не кодирующий участок в одном и том же месте — между тРНК^{Глу} и тРНК^{Фен}, нельзя исключать вероятность вторичной утраты повторов у тех тлей, в геномах которых они отсутствуют.

Еще одним плохо изученным феноменом митохондриальных геномов животных, и насекомых в том числе, являются изоформы тРНК. Как известно, изоформами тРНК называют участки, по первичной и вторичной структуре соответствующие тРНК, но лежащие внутри других генов либо на не кодирующей, либо на кодирующей цепи ДНК [9]. До сих пор доподлинно не известно, происходит ли экспрессия такого рода тРНК и, если да, что регулирует этот процесс. Не исключено, что в данном случае речь может идти о случайном сходстве первичной структуры ДНК с последовательностью тРНК, и экспрессии изоформ тРНК не происходит, однако, следует отметить, что некоторые изоформы способны образовывать классическую структуру клеверного листа с высокой долей канонических спариваний нуклеотидов [10], что, теоретически, позволяло бы им выполнять функцию нормальных митохондриальных тРНК.

Как было сказано выше, не кодирующие области в митохондриальном геноме тлей вызывают много вопросов, прежде всего, в отношении их происхождения и функции [11]. В данной статье мы представляем характеристику не кодирующих областей митохондриального генома одного из подвидов свекловично-бобовой тли — *Aphis fabae mordvilkoi* Börner &

Janisch, 1922, коллектированной в Беларуси с *Philadelphus coronarius* L. В предыдущей работе [12] мы указывали, что митохондриальный геном *A. fabae mordvilkoi* имеет типичную для тлей структуру [13], короткий repeat-регион и полный набор генов, включая гены тРНК. Здесь мы приводим результаты подробного изучения не кодирующих областей митогенома *A. fabae mordvilkoi*, делая особый акцент на их внутренней структуре. Мы полагаем, что увеличение числа такого рода работ в итоге позволит приблизиться к пониманию функции этих участков в митохондриальной ДНК тлей, если не в рамках этого исследования, то в будущем.

Материалы и методы

Описание энтомологического материала, методов экстракции ДНК, секвенирования, а также сборки и аннотации митохондриального генома *A. fabae mordvilkoi* было приведено в нашей предыдущей работе [12]. Нуклеотидная последовательность и аннотация полного митохондриального генома *A. fabae mordvilkoi* депонирована в GenBank NCBI [код доступа MG897128].

Процентное содержание каждого нуклеотида в лидирующей цепи митохондриальной ДНК рассчитали в программе MEGA 7 [14], используя технику Compute Nucleotide Composition. Асимметрию в содержании нуклеотидов (AT-skew и GC-skew) рассчитали по формулам: $AT-skew = [A - T] / [A + T]$, $GC-skew = [G - C] / [G + C]$ [15]. Поиск изоформ тРНК был проведен в полном митохондриальном геноме, включая как лидирующую, так и отстающую цепь ДНК, с использованием онлайн-сервиса ARWEN [16]. Моделирование вторичных структур изоформ тРНК и D-петли провели в программе VARNA [17]. Поиск нуклеотидных повторов провели в программе Unipro UGENE [18], визуализацию обнаруженных повторов — в программе SnapGene [19].

Результаты и обсуждение

Митохондриальный геном *A. fabae mordvilkoi*, как было сказано выше, обладает типичной для тлей структурой, содержит стандартный набор из 37 генов, и его размер составляет 15 346 п. н. [12]. В митогеноме *A. fabae mordvilkoi* также обнаруживается control-регион длиной 661 п. н., лежащий в области с 13 329 по 13 989 нуклеотид

на лидирующей цепи между генами рРНК малой субъединицы рибосомы (12S рРНК) и тРНК^{Иле} (при традиционном начале отсчета нуклеотидов в митохондриальном геноме с первого нуклеотида старт-кодона гена COI). Некодирующий участок генома, соответствующий repeat-региону, у *A. fabae mordvilkoii* располагается в типичном месте — в области с 4733 по 4929 нуклеотид лидирующей цепи ДНК между генами тРНК^{Глу} и тРНК^{Фен}, являясь, однако, значительно более коротким, чем этот же регион в митогеномах других видов тлей, у которых удавалось обнаружить длинные tandemные повторы [20].

Как известно, митохондриальные геномы насекомых отличаются выраженной нуклеотидной асимметрией с преобладанием в цепи ДНК аденина и тимина в сравнении с гуанином и цитозином, однако степень этой асимметрии различна в разных таксонах [21]. В митогеномах тлей содержание АТ обычно превышает 80%, при этом области control- и repeat-регионов отличаются особенно высоким содержанием аденинов и тимина в сравнении с нуклеотидными последовательностями как белок-кодирующих, так и РНК-кодирующих генов [15]. В митогеноме *A. fabae mordvilkoii* это правило в целом выполняется (табл. 1).

При этом в лидирующей цепи процентное содержание аденина всегда несколько превышает содержание тимина, причем наиболее выражено нуклеотидное смещение в сторону аденина в repeat-регионе (AT-skew = 0,126), в то время как в control-регионе оно меньше, чем по геному в целом (0,031 и 0,077 соответственно). Что касается соотношения количества гуанина и цитозина, то остатков цитозина в лидирующей цепи митогеномов тлей обычно значительно больше (в 1,5–2 раза), чем гуанина. В repeat-регионе *A. fabae mordvilkoii* нуклеотидное сме-

щение в сторону преобладания цитозина выражено больше, чем по геному в целом (–0,462 и –0,228 соответственно). Однако в control-регионе ситуация противоположная — количество остатков гуанина в этой области в 1,75 раз превышает количество цитозина, причем такое «обращение» значения GC-skew характерно для областей начала репликации.

Следует отметить, что для control-регионов митохондриальных геномов насекомых не характерно наличие G-трактов или CpG-областей, однако нередко обнаруживаются более или менее протяженные нуклеотидные повторы [3]. В control-регионе *A. fabae mordvilkoii* мы обнаружили короткий повтор длиной 18 п. н., располагающийся в области 170–187 и 415–432 нуклеотидов. В первом случае, ближе к 5'-концу control-региона, эта область формирует характерную для D-петель шпильку (рис. 1).

В 3'-области повтор полностью аналогичен последовательности шпильки, однако прилежащие участки ДНК не несут типичных, фланкирующих ствол петли, мотивов: предлежащих полиТ- и полиА-участков, а также позади лежащего G(A) nT-мотива [22, 23]. Кроме того, в зоне control-региона мы обнаружили 5 повторов длиной 11 п. н., 1 — 13 п. н. и 1 повтор длиной 14 п. н.

ТАТА-мотив, который также характерен для control-регионов митохондриальных геномов насекомых, как известно, может занимать варьирующее положение [24]. В control-регионе *A. fabae mordvilkoii* насчитывается 7 ТАТА-мотивов, аккумулярованных в области, предшествующей шпильке, на различном расстоянии от шпильки и друг от друга и один — в конце control-региона

Repeat-регион, или область ему соответствующая, в геноме *A. fabae mordvilkoii*, как было сказано выше, довольно короткая —

Таблица 1

Нуклеотидная композиция лидирующей цепи митохондриального генома *Aphis fabae mordvilkoii*

Область	Процентное содержание нуклеотидов							Длина, п. н.
	А	Т	Г	С	А+Т	AT-skew	GC-skew	
Полный геном	45,0	38,6	6,2	10,3	83,6	0,077	–0,248	15346
Control-регион	43,6	41,0	9,8	5,6	84,6	0,031	0,273	661
Repeat-регион	49,7	38,6	4,1	7,6	88,3	0,126	–0,462	197

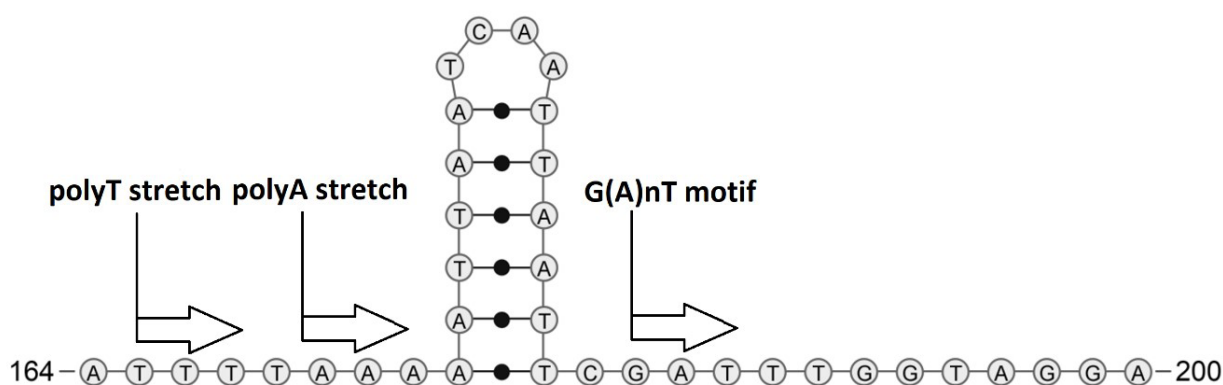


Рис. 1. Регуляторная шпилька в структуре control-региона митохондриального генома *Aphis fabae mordvilkoii* (нумерация нуклеотидов приведена относительно области, обозначенной как control-регион)

197 п. н. В геномах тлей с протяженными repeat-регионами сами повторы обычно превышают 100 п. н. в длину, а в случае, когда repeat-регион, или область ему соответствующая, короче 250–300 п. н., протяженных tandemных повторов в нем обычно обнаружить не удастся (см., например, аннотацию к митогеномам [NC_024581.1] и [NC_024683.1]) [5, 13]. В случае *A. fabae mordvilkoii* ситуация оказалась аналогичной. В некодирующей области, лежащей между генами тРНК^{Глу} и тРНК^{Фен}, не удалось обнаружить повторов, превышающих 14 п. н. в длину. Эта область митогенома *A. fabae mordvilkoii* несет многочисленные короткие повторы, как прямые, так и инвертированные, представляющие собой разнообразные АТ-мотивы. При этом число копий даже коротких повторов не превышает трех (рис. 2).

Также был проведен тщательный поиск изоформ тРНК в последовательностях обеих цепей полного митогенома *A. fabae mordvilkoii* как в кодирующих, так и в некодирующих областях. Мы обнаружили 10 изоформ тРНК (итРНК), 8 из которых лежат в областях, соответствующих каким-либо генам, но только 2 из них располагаются на смысловой для соответствующего гена цепи (табл. 2).

Как известно, не все тРНК, необходимые для синтеза белка в митохондриях, кодируются митохондриальным геномом, и недостающие тРНК синтезируются в клеточном ядре и транспортируются в митохондрию через ее мембрану [25]. Подробности этого процесса не полностью изучены даже на модельных организмах [26, 27], но, тем не менее, абсолютно очевидным кажется предположение, что все недостающие тРНК, для которых в митохондриальных белках есть кодоны, должны поступать в митохондрию извне. Много вопросов в этом смысле вызывают изоформы тРНК, поскольку, при условии их экспрессии, они могли бы принимать на себя часть функции транспорта аминокислот к рибосомам. В этом смысле обращает на себя внимание тот факт, что из 11 возможных вариантов итРНК *A. fabae mordvilkoii* только 3 имеют тот же антикодон, что и соответствующие тРНК, входящие в основной (стандартный) набор митохондриальных генов. Мы сравнили представленность в белок-кодирующих генах митохондрии *A. fabae mordvilkoii* конкретных аминокислот, для которых обнаружили итРНК, а также отдельных, кодирующих их кодонов (табл. 3).

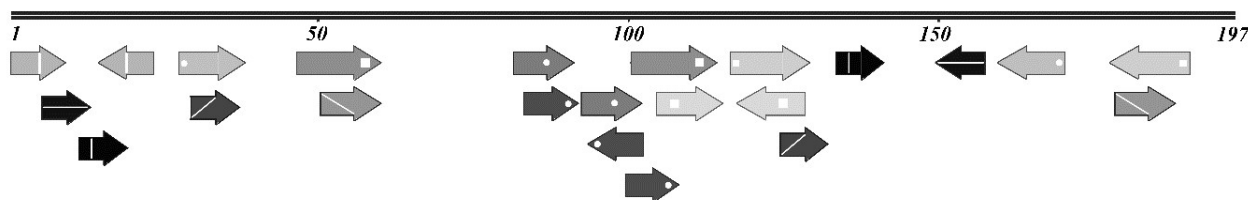


Рис. 2. Нуклеотидные повторы в структуре repeat-региона митохондриального генома *Aphis fabae mordvilkoii* (нумерация нуклеотидов приведена относительно области, обозначенной как repeat-регион; значки на стрелках и интенсивность их закрашки отмечают идентичные повторы)

Таблица 2

Характеристика изоформ тРНК в митохондриальном геноме *Aphis fabae mordvilko*

Изоформа тРНК	Локализация, нукл.	Антикодон	Цепь, код. изоформу**	Ген, локализ. в той же области	Цепь, код. ген**
<i>um</i> RNA-Asp	450–512	GUC	–	control-регион	
<i>um</i> RNA-Cys	572–626	ACA	–	control-регион	
<i>um</i> RNA-Leu*	648–703	GAG	+	12S-rRNA	–
<i>um</i> RNA-Ser*	648–703	AGA	+	12S-rRNA	–
<i>um</i> RNA-Lys	1041–1105	UUU	–	16S-rRNA	–
<i>um</i> RNA-Met	714–785	CAU	–	<i>nad2</i>	+
<i>um</i> RNA-Met	1322–1380	UAU	–	<i>cox1</i>	+
<i>um</i> RNA-Trp	1382–1440	UCA	–	<i>cox1</i>	+
<i>um</i> RNA-Tyr	1071–1133	GUA	–	16S-rRNA	–
<i>um</i> RNA-Val	310–379	AAC	+	<i>cytB</i>	+
<i>um</i> RNA-Val	1400–1472	AAC	+	<i>cox1</i>	+

Примечание. * — изоформа тРНК, образующая две возможные вторичные структуры с разными антикодонами;

** — лидирующая (главная) цепь обозначена как (+), отстающая цепь обозначена как (–)

Таблица 3

Представленность аминокислот и конкретных кодонов в белок-кодирующих генах митохондриального генома *Aphis fabae mordvilko*

Аминокислота*	Процентная частота встречаемости аминокислоты	Кодон	Антикодон**		Процентная частота встречаемости кодона
			тРНК	Изоформа тРНК	
Asp	1,42	GAU	–	–	1,31
		GAC	GUC	GUC	0,11
Cys	0,95	UGU	–	ACA	0,76
		UGC	GCA	–	0,19
Leu	15,10	UUA	UAA	–	12,92
		CUA	UAG	–	0,85
		CUU	–	–	0,71
		UUG	–	–	0,57
		CUC	–	GAG	0,05
		CUG	–	–	0,00

Продолжение табл. 3

Аминокислота*	Процентная частота встречаемости аминокислоты	Кодон	Антикодон**		Процентная частота встречаемости кодона
			тРНК	Изоформа тРНК	
Lys	3,97	AAA	—	UUU	3,61
		AAG	CUU	—	0,36
Met	8,44	AUA	—	UAU	7,92
		AUG	CAU	CAU	0,52
Ser	7,69	UCA	UGA	—	2,90
		UCU	—	AGA	2,27
		AGA	—	—	1,78
		AGU	—	—	0,52
		ACC	—	—	0,11
		AGC	GCU	—	0,11
		UCG	—	—	0,00
		AGG	—	—	0,00
Trp	2,29	UGA	UCA	UCA	2,21
		UGG	—	—	0,08
Tyr	4,73	UAU	—	—	4,21
		UAC	GUA	GUA	0,52
Val	2,30	GUU	—	AAC	1,53
		GUA	UAC	—	0,74
		GUG	—	—	0,03
		GUC	—	—	0,00

Примечание. * — приведены данные только для аминокислот, для которых в митогеноме были обнаружены итРНК; ** — при отсутствии в митохондриальном геноме тРНК и/или итРНК с соответствующим антикодоном в ячейке поставлен прочерк

Сравнение ситуации с представленностью кодонов, для которых в митогеноме есть тРНК и итРНК, показало, что возможны самые разные сочетания: тирозин и триптофан кодируются каждый двумя кодонами, при этом для каждой аминокислоты для одного из кодонов есть и тРНК, и итРНК, в то время как второй кодон, также использующийся в митохондриальных белок-кодирующих генах, не имеет ни нормальной тРНК, ни ее изоформы. С другой стороны, обнаруживаются ситу-

ации, когда итРНК несут антикодон к кодону, для которого нет тРНК в стандартном наборе, но этот кодон используется в генах довольно часто, а иногда наиболее часто для кодирования конкретной аминокислоты (например, AUA, кодирующий метионин, или GUU, кодирующий валин).

В статье, посвященной митохондриальному геному *A. fabae mordvilko* и уже упоминавшейся в этой работе [12], мы приводили модели вторичных структур всех обнаруженных тРНК.

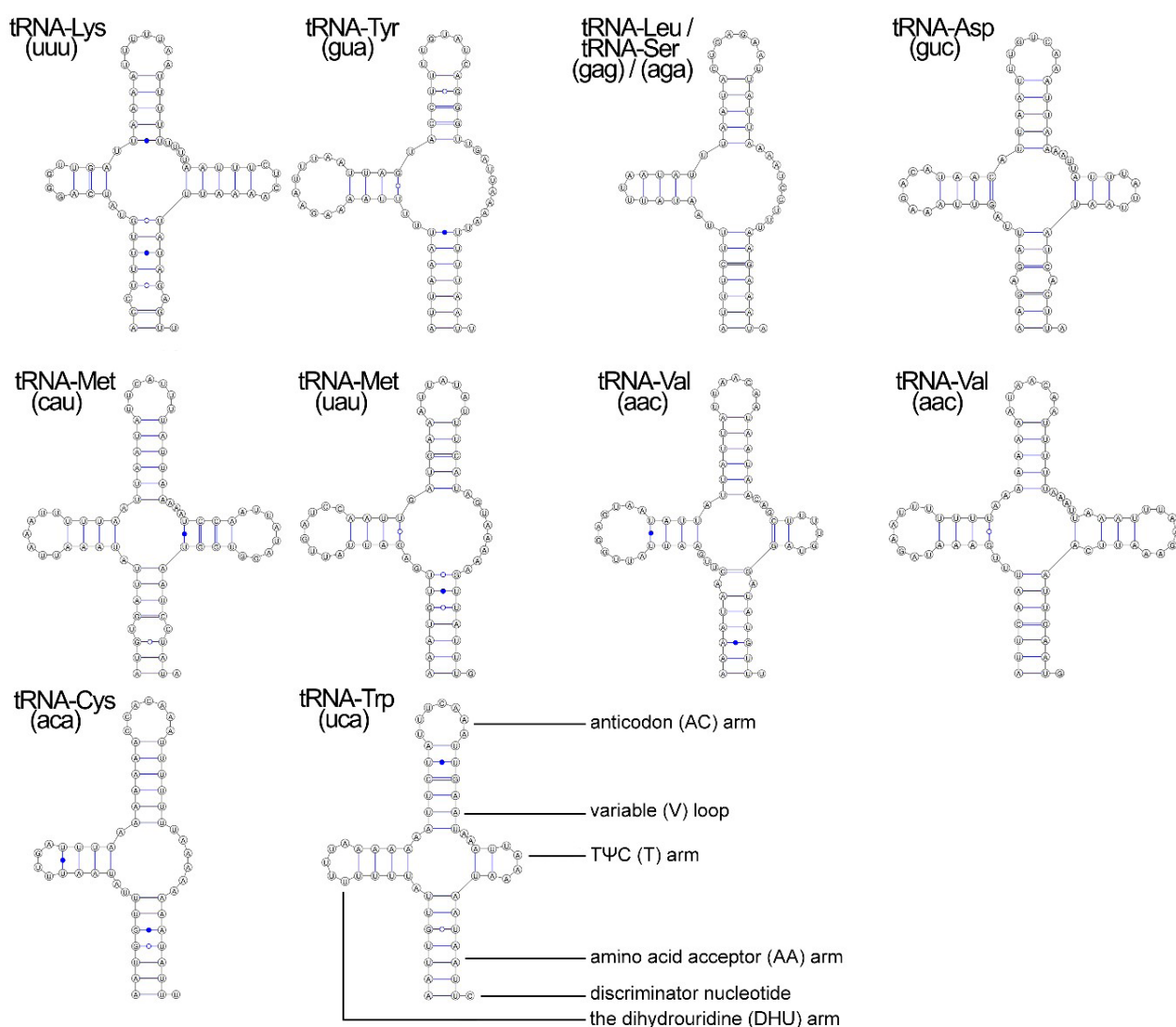


Рис. 3. Вторичная структура изоформ тРНК митохондриального генома *Aphis fabae mordvilkoi*

Мы также провели моделирование возможных вторичных структур изоформ тРНК (рис. 3).

Было обнаружено, что итРНК^{Лиз}, итРНК^{Асп}, итРНК^{Мет}_(CAU), обе итРНК^{Вал} и итРНК^{Три} обладают правильной структурой клеверного листа. итРНК^{Сер} не обладает правильной структурой, но это, в целом, типично для сериновых тРНК, в том числе, входящих в нормальный набор митохондриальных транспортных РНК (см. [12]). Причем в случае лизина, серина и валина_(AAC), это те самые итРНК, которые не имеют аналогов в стандартном наборе тРНК (см. табл. 3).

Заключение

В митогеноме *A. fabae mordvilkoi* обнаруживается сравнительно короткий некодирующий участок, соответствующий repeat-региону дру-

гих тлей, который, однако, не содержит протяженных повторов. Control-регион *A. fabae mordvilkoi* включает повтор длиной 18 п. н., идентичный последовательности регуляторной шпильки, но лежащий ниже нее, ближе к концу регуляторной области. В митохондрии этого вида тлей присутствуют 10 изоформ тРНК, 6 из которых образуют правильную структуру клеверного листа, а 3 из этих 6 — имеют антикодон, соответствующий кодону, нередко встречающемуся в белок-кодирующих последовательностях митохондриального генома, для которых, однако, нет тРНК в стандартном наборе митохондриальных транспортных РНК.

Работа поддержана грантом БРФФИ № B17-081.

Список использованных источников

- Huang, X.-L. Aphids as models for ecological and evolutionary studies: Aphids as models for ecological and evolutionary studies / X.-L. Huang, G.-X. Qiao // *Insect Science*. — 2014. — Vol. 21, № 3. — P. 247–250.
- All 37 Mitochondrial Genes of Aphid *Aphis craccivora* Obtained from Transcriptome Sequencing: Implications for the Evolution of Aphids / N. Song [et al.] // *PLOS ONE*. — 2016. — Vol. 11, № 6. — P. e0157857.
- Extensive gene rearrangements in the mitochondrial genomes of two egg parasitoids, *Trichogramma japonicum* and *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae) / L. Chen [et al.] // *Scientific Reports*. — 2018. — Vol. 8, № 1. — P. 7034.
- The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the cabbage butterfly, *Artogeia melete* (Lepidoptera: Pieridae) / G. Hong [et al.] // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. — 2009. — Vol. 41, № 6. — P. 446–455.
- Complete mitochondrial genome of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) / S. Zhang [et al.] // *Mitochondrial DNA*. — 2016. — Vol. 27, № 2. — P. 854–855.
- Zhang, D.-X. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA / D.-X. Zhang, J.M. Szymura, G.M. Hewitt // *Journal of Molecular Evolution*. — 1995. — Vol. 40, № 4. — P. 382–391.
- Cameron, S.L. Insect Mitochondrial Genomics: Implications for Evolution and Phylogeny / S.L. Cameron // *Annual Review of Entomology*. — 2014. — Vol. 59, № 1. — P. 95–117.
- Wang, Y. Comparative Analysis of Mitochondrial Genomes of Five Aphid Species (Hemiptera: Aphididae) and Phylogenetic Implications / Y. Wang, X.-L. Huang, G.-X. Qiao // *PLoS ONE*. — 2013. — Vol. 8, № 10. — P. e77511.
- The Complete Mitochondrial Genome of *Mindarus keteleerifoliae* (Insecta: Hemiptera: Aphididae) and Comparison with Other Aphididae Insects / Y. Wang [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2015. — Vol. 16, № 12. — P. 30091–30102.
- A protein extension to shorten RNA: elongated elongation factor-Tu recognizes the D-arm of T-armless tRNAs in nematode mitochondria / M. Sakurai [et al.] // *Biochemical Journal*. — 2006. — Vol. 399, № 2. — P. 249–256.
- Zhang, D.X. Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA / D.X. Zhang, J.M. Szymura, G.M. Hewitt // *J. Mol. Evol.* — 1995. — Vol. 40, № 4. — P. 382–391.
- Воронова, Н.В. Митохондриальный геном *Aphis fabae mordvilko* Börner & Janisch, 1992 / Н.В. Воронова, Ю.В. Бондаренко, С.С. Левыкина, Р.С. Шулинский // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. трудов*. — Минск, 2018. — Т. 25. — С. 74–83.
- The complete mitochondrial genome of *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) / B. Zhang [et al.] // *Mitochondrial DNA*. — 2016. — Vol. 27, № 2. — P. 945–946.
- Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Molecular Biology and Evolution*. — 2016. — Vol. 33, № 7. — P. 1870–1874.
- Wang, Y. The complete mitochondrial genome of *Cervaphis quercus* (Insecta: Hemiptera: Aphididae: Greenideinae): The mitogenome of *Cervaphis quercus* / Y. Wang, X.-L. Huang, G.-X. Qiao // *Insect Science*. — 2014. — Vol. 21, № 3. — P. 278–290.
- Laslett, D. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences / D. Laslett, B. Canback // *Bioinformatics*. — 2008. — Vol. 24, № 2. — P. 172–175.
- Darty, K. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure / K. Darty, A. Denise, Y. Ponty // *Bioinformatics*. — 2009. — Vol. 25. — P. 1974–1975.
- Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // *Bioinformatics*. — 2012. — Vol. 28, № 8. — P. 1166–1167.
- GSL Biotech [Electronic resource] — Mode of access: <http://www.snapgene.com>. — Date of access: 27.12.2017.
- Jager, L. de. Complete Mitochondrial Genome of *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae) from Nine Populations, SNP Variation between Populations, and Comparison with Other Aphididae Species / L. de Jager, N.F.V. Burger, A.-M. Botha // *African Entomology*. — 2014. — Vol. 22, № 4. — P. 847–862.

21. Phylogenetic approaches for the analysis of mitochondrial genome sequence data in the Hymenoptera — A lineage with both rapidly and slowly evolving mitochondrial genomes / M. Dowton [et al.] // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. — 2009. — Vol. 52, № 2. — P. 512–519.
22. Boore, J.L. Animal mitochondrial genomes / J.L. Boore // *Nucleic Acids Research*. — 1999. — Vol. 27, № 8. — P. 1767–1780.
23. Zhang, D.-X. Insect mitochondrial control region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies / D.-X. Zhang, G.M. Hewitt // *Biochemical Systematics and Ecology*. — 1997. — Vol. 25, № 2. — P. 99–120.
24. The complete mitochondrial genome of *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae) indicates extensive independent evolutionary events / S. Wei [et al.] // *Genome*. — 2009. — Vol. 52, № 4. — P. 308–319.
25. Gray, M.W. The origin and early evolution of mitochondria / M.W. Gray, G. Burger, B.F. Lang // *Genome Biol*. — 2001. — Vol. 2, № 6. — P. REVIEWS1018.
26. Schneider, A. Mitochondrial tRNA Import and Its Consequences for Mitochondrial Translation / A. Schneider // *Annual Review of Biochemistry*. — 2011. — Vol. 80, № 1. — P. 1033–1053.
27. tRNA dynamics between the nucleus, cytoplasm and mitochondrial surface: Location, location, location / K. Chatterjee [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Gene Regulatory Mechanisms*. — 2018. — Vol. 1861, № 4. — P. 373–386.

N.V. Voronova, S.S. Levykina, Y.V. Bandarenka, R.S. Shulinski

NON-CODING REGIONS IN THE MITOCHONDRIAL GENOME OF *APHIDS APHIS FABAE MORDVILKOI* BÖRNER & JANISCH, 1922

Belarusian State University
Minsk, 220030, the Republic of Belarus

The analysis results of non-coding regions in the mitochondrial genome of *Aphis fabae mordvilkoii* are shown in this Article. It was found that the control-region carries a short repeat in 5' area, which is identical to the stem-loop structure typical for the D-loop region. The region known as the repeat-region does not have any tandem repeats longer than 14 bp. There are 10 tRNA isoforms in the *A. fabae mordvilkoii* mitogenome. Six tRNA isoforms have a cloverleaf structure and three isoforms out of six have anticodons, which are not presented in tRNAs of the aphid mitochondrial genome.

Ключевые слова: aphids, mitochondrial genome, *Aphis fabae mordvilkoii*, tRNA and D-loop isoforms, repeat-region.

Дата поступления статьи: 30 января 2019 г.

Р.И. Шейко

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПЛЕМЕННЫХ СТАД СВИНЕЙ И ПОВЫШЕНИЕ ИХ ПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: R.I.Sheyko@igc.by

Созданы селекционные стада финальных родительских форм ЙхЛ и ЛхЙ. Изучена генетическая структура выборки животных пород ландрас и йоркшир по генам *RYRI*, *ESR*, *EPOR* и *PRLR*. Выявлены животные с предпочтительными генотипами *RYRI*^{NN} (100%), *ESR*^{BB} (10,4–26,7%), *PRLR*^{AA} (5,2–46,3%), *EPOR*^{TT} (27,1%), ассоциированные с более высокими показателями продуктивности. Установлено превосходство свиней с генотипами *ESR*^{BB}, *PRLR*^{AA}, *EPOR*^{TT} по показателям многоплодия и молочности над животными других генотипов на 7,8–9,3% и 9,0–13,2%, 5,9–20,4% и 10,0–21,0%, 12,4% и 5,4% соответственно.

Ключевые слова: порода, ландрас, йоркшир, родительская форма, собственная продуктивность, репродуктивные качества, ДНК-маркеры.

Введение

Современное животноводство как в нашей стране, так и за рубежом развивается и совершенствуется на основе достижений генетики и биотехнологии.

В настоящее время в селекционной работе со свиньями широко используются новые подходы, основанные на применении ДНК-маркеров признаков продуктивности этих животных. В отличие от методов традиционной селекции использование ДНК-маркеров позволяет проводить оценку животных непосредственно на уровне генотипа, что не требует использования сложных математических методов оценки генетического потенциала, направленных на вычленение из проявления признака его генетической составляющей.

При использовании ДНК-маркеров селекционные решения в работе с животными могут приниматься в их раннем возрасте, что сокращает затраты на проведение оценки последних [1–3]. Из многообразия существующих генетических маркеров отобраны ген *RYR-I*, ассоциированный с индуцируемой стрессом злокачественной гипертермией, ген *ESR* эстрогенового рецептора, ген *EPOR* эритропоэтинового рецептора и ген *PRLR* пролактинового рецептора, детерминирующий проявление репродуктивных качеств

свиней, анализ полиформизма которых играет важную роль в интенсификации селекционного процесса, направленного не только на повышение эффективности селекции свиней, но и на возможность прогнозирования уровня количественных признаков в раннем возрасте [4–7].

В задачи исследований входило:

- определить селекционно-генетические параметры признаков продуктивности животных родительских форм;

- определить генетическую структуру стад животных родительских форм по желательным маркерам генов *RYRI*, *ESR*, *EPOR*, *PRLR* и ассоциацию данных генов с воспроизводительными качествами;

- определить селекционно-генетические параметры признаков продуктивности животных родительских форм [3, 4];

- определить комплексное влияние генов на продуктивность животных [5, 6].

Материалы и методы

Исследования проводились на свиноводческом комплексе-репродукторе 1-го порядка на одну тысячу основных свиноматок «Рассошное» Республиканского предприятия по племенному делу «ЖодиноАгроПлемЖЭлита» Смолевичского района Минской области.

Объектом исследования являлись животные пород ландрас и йоркшир импортной селекции.

У завезенных животных пород ландрас и йоркшир был изучен полиморфизм ряда генов. Анализ ДНК проводили в лаборатории гибридизации сельскохозяйственных животных РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству». Для изучения полиморфизма генов *RYR*, *ESR*, *EPOR*, *PRLR* у исследуемых животных были взяты биопробы ткани уха, из которых выделена ДНК перхлоратным методом. Генотипирование свиней проводили методом ПЦР-ПДРФ [7–9].

ПЦР проводилась согласно Т.Н. Short et al. с некоторыми изменениями температурных и временных профилей реакции: концентрация, нативность, подвижность ДНК, концентрация и специфичность амплифицированных фрагментов генов.

Кормление свиней различных половозрастных групп осуществлялось полнорационными комбикормами согласно действующим нормам с учетом технологических особенностей содержания и использования отдельных производственных групп свиней в племенных предприятиях.

Биометрическая обработка полученных материалов исследований проведена по методу вариационной статистики по П.Ф. Рокицкому на персональном компьютере с использованием пакета программы Microsoft Excel [10].

Результаты и их обсуждение

Использование генетических маркеров продуктивности позволяет усовершенствовать генетический потенциал пород свиней и повышает эффективность селекционной работы. Установлено, что причиной восприимчивости свиней к стрессу является точковая мутация в гене *RYR1*, представляющая собой транзицию цитозина на тимин в позиции 1843, что обуславливает, в свою очередь, синтез аргинина вместо цистеина в 615 позиции полипептидной цепи рианодин-рецепторного белка. На основании этих данных разработан генетический тест, позволяющий выявлять аллельные варианты гена *RYR1* (желательный аллель *RYR1^N* и мутантный *RYR1ⁿ*) с помощью метода ПЦР-ПДРФ [11, 12].

В результате генетического тестирования животных пород ландрас и йоркшир различных половозрастных групп (хряки-производи-

тели и свиноматки) по гену *RYR1* идентифицирован только один генотип свиней *RYR1^{NN}*, особи стрессоустойчивые. Гетерозигот *Nn RYR1* гена (стрессоустойчивые скрытые носители) и стресс-чувствительных гомозигот *nn RYR1* гена не выявлено.

Таким образом, отсутствие в проанализированной выборке мутантного п-аллеля гена *RYR1*, ассоциируемого со стрессовой чувствительностью животных пород ландрас и йоркшир, указывает на то, что в дальнейшем полномасштабную молекулярно-генетическую диагностику всех животных можно не проводить. С целью исключения распространения в популяции мутантного п-аллеля *RYR1* гена, ассоциированного со стресс-чувствительностью, достаточно проведения ДНК-диагностики среди используемых ремонтных хряков.

Репродуктивные признаки являются одними из наиболее важных в селекции свиней. Наиболее тесная ассоциация с этими признаками была установлена для гена эстрогенового рецептора (*ESR*). Этот ген кодирует альфа-рецептор эстрогенных гормонов, которые участвуют в регуляции активности репродуктивной системы самок [13].

Полиморфизм гена *ESR* обусловлен двумя транзициями 65А→G, 68Т→G. Сайтом узнавания для рестриктазы *AluI* является последовательность 5'CAG↓CTG-3. Только наличие двух SNP в сайте узнавания рестриктазой идентифицирует В-аллель, а отсутствие диполиморфизма (double polymorphism) — аллель А.

Анализ полученных результатов генетического тестирования чистопородных животных породы ландрас и йоркшир позволил выявить частоты встречаемости аллелей гена *ESR* (табл. 1).

При изучении полиморфизма гена *ESR* у животных породы ландрас были выявлены все три генотипа *ESR^{AA}*, *ESR^{AB}*, *ESR^{BB}*. У хряков-производителей, как и у свиноматок, преобладали гетерозиготы *ESR^{AB}* (53,3% и 52,0% соответственно).

Гомозиготный генотип *ESR^{AA}* встречался с частотой 33,4% у хряков-производителей, у свиноматок — 8,0%, генотип *ESR^{BB}* — 13,3% и 40,0% соответственно. Частоты встречаемости аллелей *ESR^A* и *ESR^B* у исследуемых групп животных составили 0,60 и 0,34 и 0,40 и 0,60 соответственно.

Таблица 1

Частоты генотипов и аллелей гена *ESR* у животных пород ландрас и йоркшир

Половозрастная группа	Кол-во (n)	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей, % аллелей	
		AA	AB	BB	A	B
Йоркшир						
Хряки-производители	17	58,8	41,2	–	0,79	0,21
Свиноматки	24	12,5	66,7	20,8	0,46	0,54
Среднее	–	35,6	54,0	10,4	0,63	0,37
Ландрас						
Хряки-производители	15	33,4	53,3	13,3	0,60	0,40
Свиноматки	25	8,0	52,0	40,0	0,34	0,66
Среднее	–	20,7	52,6	26,7	0,47	0,53

Среди хряков породы йоркшир не выявлены особи генотипа *ESR^{BB}*. При этом соотношение двух других генотипов *ESR^{AA}* и *ESR^{AB}* составили у хряков 58,8% и 41,2%, у свиноматок — 12,5% и 66,7% соответственно. В популяции свиноматок концентрация гомозиготного генотипа *ESR^{BB}* составила 20,8%. Частота встречаемости аллелей *ESR^A* и *ESR^B* у хряков и свиноматок породы йоркшир составили 0,79 и 0,46 и 0,21 и 0,54 соответственно.

Перспективным приемом повышения воспроизводительных качеств свиней является использование ДНК-маркеров плодовитости. Особенность воспроизводства поголовья в свиноводстве основана на биологической способности свиней к многоплодию и выкармливанию поросят, которая обусловлена действием сложных гуморальных и физиологических процессов и регулируется действием комплекса генов, одним из которых является ген *PRLR*.

Рецептор пролактина — это специфический рецептор гормона передней доли гипофиза — пролактина (*PRLR*), который в организме млекопитающих участвует в регуляции роста, метаболизма и размножения. Ген *PRLR* у свиней картирован на хромосоме 16 (*SSC16*). Полиморфизм обусловлен нуклеотидной заменой G→A, которая приводит к аминокислотной замене 597GeY→Ser. Сайтом узнавания для рестриктазы *ALu1* является последовательность 5'-AG↓CT-3'.

При наличии двух сайтов узнавания идентифицируется А-аллель гена *PRLR*. Если же отсутствует один из сайтов, то идентифицируется аллель В [14].

Проведение селекции, направленной на разведение животных с предпочтительными генотипами, позволит до 18% увеличить многоплодие маток и до 16,8% — воспроизводительную функцию хряков-производителей. В связи с этим большой интерес представляет изучение полиморфизма гена *PRLR*. В результате проведенных исследований у животных пород ландрас и йоркшир выявлен полиморфизм гена *PRLR*, представленный двумя аллелями — А и В, а также выявлены все три генотипа — AA, AB и BB гена пролактинового рецептора. Анализ генетической структуры выборки животных породы ландрас выявил, что частота встречаемости желательного генотипа *PRLR^{AA}* составила 52,2% у свиноматок и 40,3% у хряков-производителей, и аллеля *PRLR^A* — 0,70 и 0,63 соответственно. У животных породы йоркшир процент встречаемости животных с генотипом *PRLR^{AA}* находился в пределах от 4,2 у свиноматок до 6,1 у хряков-производителей (табл. 2).

Проведена ДНК-идентификация животных пород ландрас и йоркшир по гену эритропоэтинового рецептора (*EPOR*), полиморфизм которого ассоциирован с размером матки и, соответственно, размером гнезда при рождении — многоплодием.

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей *PRLR* гена в анализируемой выборке животных пород ландрас и йоркшир

Половозрастная группа	Кол-во (n)	Частота генотипов, %			Частота аллелей,%	
		AA	AB	BB	A	B
Ландрас						
Свиноматки	25	52,2	35,8	12,0	0,70	0,30
Хряки-производители	15	40,3	46,7	13,0	0,63	0,37
Среднее	—	46,3	41,2	12,5	0,68	0,32
Йоркшир						
Свиноматки	24	4,2	87,5	8,3	0,48	0,52
Хряки-производители	17	6,1	86,7	7,2	0,50	0,50
Среднее	—	5,2	87,1	7,7	0,49	0,51

ДНК-типирование животных на выявление предпочтительного генотипа гена эритропоэтинового рецептора *EPOR* у свиноматок позволяет повысить количество зрелых яйцеклеток на 3,2% и увеличить многоплодие на 0,62 поросят.

Данный ген локализован на второй хромосоме. Его полиморфизм обусловлен точковой мутацией, обнаруженной в интроне 4 (тимин→цитозим). Белок EPOR кодируется геном рецептора эритропоэтина, основная роль которого сводится к стимуляции эритроидных клеток — предшественников эритроцитов. Механизм запуска экспрессии гена *EPOR* связан со стимуляцией передачи сигнала от клеточной мембраны к ядру активирующего в частности транскрипцию эритроид-специфичного гена *GATA'2* [15].

В геномах протестированных животных выявлено два аллеля: аллель дикого типа *EPOR^C* и мутантный Т-аллель. Идентифицированы гомозиготный по мутантному аллелю генотип *EPOR^{TT}*, гетерозиготный генотип *EPOR^{CT}* (скрытые носители мутантного аллеля) и гомозиготный генотип *EPOR^{CC}*.

При изучении генетической структуры выборки особей из популяции на межпородном уровне выявлены значительные колебания частот встречаемости мутантного аллеля *EPOR^T* среди животных пород ландрас и йоркшир. Наибольшей средней частотой встречаемости

аллеля *EPOR^T* характеризовались животные породы ландрас — 0,55, у животных породы йоркшир — 0,29 (табл. 3).

При проведении оценки частот встречаемости предпочтительного Т-аллеля среди различных половозрастных групп исследуемых пород установлено, что наименьшую концентрацию аллеля *EPOR^T* имели животные породы йоркшир: от 0,23 у свиноматок, до 0,35 у хряков-производителей. У породы ландрас частота встречаемости этого аллеля составила 0,52 и 0,57 соответственно. По локусу гена *EPOR* в исследуемой группе свиней породы ландрас половина животных имели гетерозиготный генотип *EPOR^{CT}*: хряки-производители — 45,3%, свиноматки — 54,9%, у животных породы йоркшир — 67,3% и 46,4% соответственно. Среди животных породы йоркшир гомозиготный генотип *EPOR^{TT}* не выявлен.

Полученные результаты генотипирования позволили определить генетическую структуру выборки свиней по генам *RYR*, *ESR*, *EPOR* и *PRLR*, установить предпочтительные и нежелательные аллели, что делает возможным их использование для установления взаимосвязи данных генов с продуктивными качествами свиней пород ландрас и йоркшир.

Результаты исследований ассоциации гена *ESR* с показателями репродуктивных качеств свиноматок исследуемых пород представлены в табл. 4.

Таблица 3

Частоты генотипов и аллелей *EPOR* гена в выборке животных пород ландрас и йоркшир

Половозрастная группа	Кол-во, (n)	Частота генотипов, %			Частота аллелей, %	
		ТТ	СТ	СС	Т	С
Ландрас						
Свиноматки	25	25,7	54,9	19,4	0,52	0,48
Хряки-производители	15	28,4	45,3	26,3	0,57	0,43
Среднее	—	27,1	50,1	22,8	0,55	0,45
Йоркшир						
Свиноматки	24	—	46,4	53,6	0,23	0,77
Хряки-производители	17	—	67,3	32,7	0,35	0,65
Среднее	—	—	56,9	43,1	0,29	0,71

Таблица 4

Продуктивность свиноматок пород ландрас и йоркшир в зависимости от полиморфизма гена *ESR*

Показатели	Генотипы животных <i>ESR</i> гена		
	АА	АВ	ВВ
Йоркшир			
Количество маток, голов	3	16	5
Многоплодие, гол.	11,6 ± 0,3	12,1 ± 0,1	12,5 ± 0,2*
Молочность, кг	55,7 ± 1,2	58,5 ± 0,6	60,7 ± 1,0**
Масса гнезда при рождении, кг	17,0 ± 0,3	17,0 ± 0,2	17,6 ± 0,5
Количество поросят при отъеме, гол.	10,4 ± 0,1	10,6 ± 0,09	11,5 ± 0,2**
Масса гнезда при отъеме в 35 дней, кг	90,3 ± 2,7	91,0 ± 1,52	94,0 ± 1,52
Сохранность, %	89,7	87,6	92,0
Ландрас			
Количество маток, голов	2	13	10
Многоплодие, гол.	11,8 ± 0,50	12,5 ± 0,50	12,9 ± 0,40*
Молочность, кг	51,4 ± 2,50	55,3 ± 0,87	58,2 ± 1,18*
Масса гнезда при рождении, кг	17,2 ± 0,44	16,6 ± 0,23	16,7 ± 0,53
Количество поросят при отъеме, гол.	10,0 ± 0,1	10,8 ± 0,2	11,8 ± 0,1***
Масса гнезда при отъеме в 35 дней, кг	89,6 ± 0,40	94,4 ± 0,68	100,0 ± 0,53***
Сохранность, %	84,7	86,4	91,5

Примечание. * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$

Анализ данных показал, что свиноматки породы йоркшир генотипа ESR^{BB} (предпочтительный) превосходили свиноматок генотипов ESR^{AB} и ESR^{AA} по многоплодию на 0,4 и 0,9 гол., или 3,3% и 7,8%, молочности — на 2,2 и 5,0 кг, или 3,8 и 9,0%, массе гнезда при рождении — на 0,6 кг, или 3,5%, сохранности — на 2,3 и 4,4 п. п.

Данные по породе ландрас свидетельствуют о том, что животные генотипа ESR^{AA} уступали своим сверстникам с генотипами ESR^{AB} и ESR^{BB} по массе гнезда при отъеме на 4,8 и 10,4 кг, или 5,1 и 10,4%, по сохранности — на 1,7 и 6,8 п. п. и молочности — на 3,9 и 6,8 кг, или 7,1 и 11,7%, соответственно. Особи с гомозиготным генотипом ESR^{BB} обладали превосходством по многоплодию над животными с гомозиготным генотипом ESR^{AA} на 1,1 гол. (9,3%) и гетерозиготным генотипом

ESR^{AB} — на 0,4 гол. (3,2%). По массе гнезда при рождении лучшие показатели были у свиноматок с генотипом ESR^{AA} : на 0,6 и 0,5 кг, чем у маток с генотипами ESR^{AB} и ESR^{BB} соответственно. Однако по сохранности поросят к отъему предпочтительными генотипами являются ESR^{BB} (91,5%) и ESR^{AB} (86,4%).

Сравнительные исследования свиноматок породы ландрас с разными генотипами $PRLR$ показали, что по многоплодию отличались особи, несущие в своем геноме А-аллель гена $PRLR$ (11,5–13,0 поросят). Они превосходили сверстниц с генотипом ВВ по этому показателю на 0,7–2,2 головы (табл. 5). Однако при рождении более крупные были поросята, несущие в своем геноме В-аллель (1,24–1,30 кг), которые превосходили по этому показателю аналогов с генотипом АА на 0,12–0,18 кг. По количеству поросят и массе гнезда при отъеме

Таблица 5

Репродуктивные качества свиноматок пород йоркшир и ландрас в зависимости от генотипа по гену $PRLR$

Показатели	Генотипы животных $PRLR$ гена		
	АА	АВ	ВВ
Ландрас			
Количество маток, голов	13	9	3
Многоплодие, гол.	13,0 ± 0,54*	11,5 ± 0,42	10,8 ± 0,32
Молочность, кг	64,9 ± 11,32**	55,5 ± 1,21	53,2 ± 1,28
Масса гнезда при рождении, кг	14,6 ± 0,69	14,3 ± 0,58	14,1 ± 0,89
Количество поросят при отъеме, гол.	12,0 ± 0,19**	10,5 ± 0,16	10,0 ± 0,20
Масса гнезда при отъеме в 35 дней, кг	104,3 ± 2,2*	101,3 ± 6,5	98,2 ± 1,28
Сохранность, %	92,3	91,3	92,6
Йоркшир			
Количество маток, голов	1	21	2
Многоплодие, гол.	12,5	12,0 ± 0,2	11,8 ± 0,2
Молочность, кг	59,6	54,7 ± 1,1	54,4 ± 0,9
Масса гнезда при рождении, кг	16,2	16,9 ± 0,3	16,8 ± 0,4
Количество поросят при отъеме, гол.	11,6	10,6 ± 0,2	10,5 ± 0,1
Масса гнезда при отъеме в 35 дней, кг	107,1	99,1 ± 2,2	98,8 ± 1,9
Сохранность, %	92,8	89,4	89,2

Примечание. * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$

имели превосходство животные с генотипами АА (12,0 голов и 104,3 кг) и АВ (10,5 голов и 101,3 кг), что несколько выше, чем у аналогов с генотипом ВВ на 0,5–2,0 головы и 3,1–6,1 кг ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$). Сохранность гнезда к моменту отъема у животных с разными генотипами уменьшалась в следующем порядке ВВ>АА>АВ. Аналогичная ситуация по продуктивным качествам прослеживалась и у животных в породе йоркшир. Из 24 протестированных животных 21 голова унаследовали гетерозиготный генотип АВ, у которых многоплодие составило 12,0 голов, молочность — 54,7 кг, масса гнезда при рождении — 16,9 кг, количество поросят и масса гнезда при отъеме — 10,6 голов и 99,1 кг, сохранность — 89,4%. Выборка животных-носителей гомозиготных генотипов АА и ВВ по данному гену была незначительна, однако следует отметить положительную тенденцию по увеличению репродуктивных качеств свиноматок генотипа АА.

Для селекционного процесса важно также установить количество и качество спермопродукции хряков-производителей разных генотипов гена *PRLR* (табл. 6). Выявлено, что данный ген у хряков стимулирует функцию придаточных половых желез, что способствует увеличению объема эякулята и выживаемости спермиев.

Исучаемые показатели спермопродукции хряков характеризуются высокими коэффици-

ентами вариабельности, что свидетельствует о значительных индивидуальных особенностях производителей в данной выборке.

Установлено, что в анализируемой выборке большинство животных по гену пролактинового рецептора в обеих породах имеют гетерозиготный генотип АВ (у йоркшира — у 15 особей из 17 проанализированных, у ландраса — у 7 из 15 хряков). Однако следует отметить, что более высокие качественные показатели спермы обеих пород были у хряков с генотипом АА гена *PRLR*: объем эякулята — 268 и 281 мл, концентрация спермиев — 0,20 и 0,21 млн/мл, количество спермиев в эякуляте — 42,5 и 44,7 млрд соответственно.

Количество животных в породе йоркшир с генотипами АА и ВВ гена *PRLR* достаточно малое, а при анализе, очевидно, большое влияние на показатели спермопродукции имели индивидуальные особенности животных.

Анализ показателей спермопродукции производителей в породе ландрас различных генотипических групп показал, что хряки генотипа *PRLR*^{АА} превосходили хряков генотипа *PRLR*^{ВВ} по объему эякулята на 19 мл, или 7,6%, по количеству спермиев в эякуляте — на 3,3 млрд, или 8,4%. По концентрации спермиев различий не выявлено, данный показатель находился на уровне 0,20 млрд/мл, а у животных-носителей гетерозиготного генотипа АВ — 0,18 млрд/мл.

Таблица 6

Ассоциация гена пролактинового рецептора с качественными показателями спермы хряков

Генотип	Количество животных, гол.	Объем эякулята, мл	Концентрация спермиев, млрд/мл	Количество спермиев в эякуляте, млрд
Йоркшир				
АА	1	281	0,21	44,7
АВ	15	268 ± 54,2	0,19 ± 0,011	34,8 ± 7,2
ВВ	1	230	0,16	27,1
Ландрас				
АА	6	268 ± 47,2	0,20 ± 0,015	42,5 ± 11,3**
АВ	7	249 ± 51,6	0,20 ± 0,022	39,2 ± 6,5**
ВВ	2	210 ± 54,3	0,18 ± 0,018	21,4 ± 3,2

Примечание. * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$

Таблица 7

Ассоциация полиморфных вариантов *EPOR* гена с продуктивностью свиноматок

Показатели	Генотипы животных <i>EPOR</i> гена		
	ТТ	СТ	СС
Ландрас			
Количество маток, голов	6	14	5
Многоплодие, гол.	11,8 ± 0,23**	11,0 ± 0,19	10,5 ± 0,13
Молочность, кг	54,7 ± 1,03	54,1 ± 0,90	51,9 ± 1,40
Масса гнезда при рождении, кг	16,5 ± 0,40	17,2 ± 0,26*	15,6 ± 0,34
Количество поросят при отъеме, гол.	10,8 ± 0,13*	–10,0 ± 0,17	9,5 ± 0,07
Масса гнезда при отъеме в 35 дней, кг	94,6 ± 1,59*	89,3 ± 2,65	91,3 ± 2,16
Сохранность, %	91,5	90,9	90,5
Йоркшир			
Количество маток, голов	–	11	13
Многоплодие, гол.	–	12,2 ± 0,31*	11,6 ± 0,31
Молочность, кг	–	54,9 ± 0,72	54,4 ± 1,61
Масса гнезда при рождении, кг	–	18,0 ± 0,34**	16,1 ± 0,29
Количество поросят при отъеме, гол.	–	11,0 ± 0,09**	9,6 ± 0,28
Масса гнезда при отъеме в 35 дней, кг	–	97,0 ± 1,52**	90,3 ± 1,68
Сохранность, %	–	90,2	82,8

Примечание. * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$

Результаты проведенных исследований ассоциации полиморфных вариантов гена *EPOR* с продуктивностью свиноматок представлены в табл. 7. Установлено, что наибольшее количество животных породы ландрас по полиморфным вариантам гена *EPOR* имело гетерозиготный генотип *EPOR*^{СТ}. Свиноматки генотипа *EPOR*^{ТТ} превосходили свиноматок генотипа *EPOR*^{СС} по многоплодию на 1,3 гол., или 12,4%, а среди свиноматок генотипов *EPOR*^{СТ} и *EPOR*^{СС} данная разница составила 0,5 головы, или 4,8%, соответственно. Также выявлена тенденция положительного влияния генотипа свиней *EPOR*^{ТТ} в сравнений со свиноматками генотипа *EPOR*^{СС} на такие показатели репродуктивных качеств, как молочность 2—,8 кг, или 5,4%, количество поросят к отъему — на 1,3 гол., или 13,7%, массу гнез-

да при отъеме — на 3,3 кг, или 3,6%, сохранность поросят — 2,1 п. п. Положительная динамика анализируемых показателей отмечена и среди свиноматок генотипа *EPOR*^{СТ}.

Что касается свиноматок породы йоркшир гетерозиготного генотипа *EPOR*^{СТ}, была установлена тенденция увеличения численности поросят при рождении на 0,6 голов в сравнении с матками генотипа *EPOR*^{СС} ($p \leq 0,05$).

Также установлено, что масса гнезда при рождении, в 21 день и при отъеме у свиноматок гетерозиготного генотипа *EPOR*^{СТ} была выше на 1,9, 0,5 и 6,7 кг соответственно, а сохранность поросят к отъему — на 7,4 процентных пункта, чем у свиноматок генотипа *EPOR*^{СС} ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$). Животных, носителей генотипа ТТ *EPOR* гена в породе йоркшир не выявлено.

Заключение

Созданы селекционные стада финальных родительских свинок пород ландрас и йоркшир, обладающих высокими репродуктивными качествами.

Изучена генетическая структура выборки животных пород йоркшир и ландрас по генам *RYR*, *ESR*, *EPOR*, *PRLR*. Выявлены животные с частотой встречаемости предпочтительных генотипов в выборке животных пород йоркшир и ландрас в среднем составляет: RYR^{1NN} (100%), ESR^{BB} (10,4–26,7%), $PRLR^{AA}$ (5,2–46,3%), $EPOR^{TT}$ (27,1%).

Установлено превосходство свиней обеих пород указанных предпочтительных генотипов по показателям многоплодия и молочности соответственно на 7,8–9,3% и 9,0–13,2%; 5,9–20,4% и 10,0–21,0%, а также 12,4% и 5,4%. Выявлено превосходство свиноматок пород ландрас и йоркшир генотипа $ESR^{BB}RYR^{1NN}$ над животными с генотипом $ESR^{AA}RYR^{1NN}$ по количеству поросят к отъему на 9,0–10,5% соответственно.

Таким образом, использование животных с желательными генотипами и элиминация нежелательных генотипов позволяет повысить и удержать на высоком уровне продуктивные качества животных.

Список использованных источников

1. Эрнст, Л.К. Биотехнология в животноводстве: современные достижения и перспективы / Л.К. Эрнст // Современные достижения и перспективы биотехнологии сельскохозяйственных животных : материалы междунар. науч. конф. — Дубровицы, 2003. — С. 7–17.
2. Достижения и перспективы использования ДНК-технологий в свиноводстве: моногр. / Т.И. Епишко [и др.]. — Витебск: УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины». — 2012. — 257 с.
3. Зиновьева, Н.А. Современное состояние и перспективы биотехнологии в животноводстве / Н.А. Зиновьева, Л.К. Эрнст. — Дубровицы: ВИЖ. — 2006. — 375 с.
4. Республиканская программа по племенному делу в животноводстве на 2011–2015 годы: утв. Постановлением Совета Министров Республики Беларусь № 1917 от 31 декабря 2010 г. [Электронный ресурс] /

Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь. — Минск, 2013. — Режим доступа: http://www.pravo.by/pdf/2011-32/2011_32_9_39056.pdf. — Дата доступа: 14.10.2015.

5. Зоотехнические правила по определению племенной ценности животных / Республиканская программа по племенному делу в животноводстве на 2007–2010 годы. Основные зоотехнические документы по селекционно-племенной работе в животноводстве: сб. технологической документации / разработ.: Н.А. Попков [и др.]. — Жодино: Науч.-практический центр НАН Беларуси по животноводству. — 2008. — С. 440–446.

6. Эрнст, Л.К. Генная инженерия — важнейший фактор селекции сельскохозяйственных животных 21 века / Л.К. Эрнст // ДНК-технологии в клеточной инженерии и маркирование признаков сельскохозяйственных животных : материалы междунар. науч. конф. — Дубровицы, 2001. — С. 7–18.

7. Калашникова, Л.А. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко. — Лесные Поляны: ВНИИПлем, 1999. — 148 с.

8. Епишко, Т.И. Интенсификация селекционных процессов в свиноводстве с использованием классических методов генетики и ДНК-технологии : дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.02.01 / Т.И. Епишко. — Жодино, 2008. — 346 с.

9. Зиновьева, Н.А. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н.А. Зиновьева [и др.] // ВИЖ. — 2002. — С. 68–70.

10. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий // Изд. 3-е, испр. — Минск: Вышэйш. школа. — 320 с.

11. Гладырь, Е.А., Изучение генома свиней (*Sus scrofa*) с использованием ДНК-маркеров / Е.А. Гладырь, Л.К. Эрнст, О.В. Костюнина // Сельскохозяйственная биология. — 2009. — Vol 2. — С. 16–26.

12. Ассоциация полиморфизма гена *RYR1* с показателями продуктивных качеств свиней пород, разводимых в Беларуси / В.К. Пестис [и др.] // Молодой ученый. — 2015. — Vol. 5.2. — С. 33–37.

13. Terman, A. Estrogen receptor gene (*ESR*) and semen characteristics of boars / A. Terman, M. Kmiec, D. Polasik // Arch. Tierz., Dummerstorf. — 2006. — Vol. 49. — С. 71–76.

14. Шейко, И.П. Селекция на повышение многоплодия свиноматок крупной белой породы методом молекулярной генной диагностики / И.П. Шейко [и др.] // Весці

нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. — 2006. — Т. 3. — С. 77–81.

15. Дойлидов, В.А. Ген эритропоэтинового рецептора (*EPOR*) — новый ген-маркер многоплодия свиноматок / В.А. Дойлидов, Н.А. Лобан, Д.А. Каспирович // Ученые записки УО «ВГАВМ». — 2009. — Т. 45, № 1, ч. 2. — С. 82–85.

R.I. Sheiko

ANALYSIS OF THE GENETIC STRUCTURE OF PIG-BREEDING HERDS AND IMPROVING THEIR PRODUCTIVE QUALITIES USING DNA MARKERS

Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

Breeding herds of final parental forms in the amount of 87 heads of the parent pig (YxL) and 76 heads (LxY) have been formed. The genetic structure of Landrace and Yorkshire breed samples has been studied by *RYR1*, *ESR*, *EPOR* and *PRLR* genes. Animals with the preferred genotypes *RYR1^{NN}* (100%), *ESR^{BB}* (10.4–26.7%), *PRLR^{AA}* (5.2–46.3%), and *EPOR^{TT}* (27.1%) associated with higher productivity indices have been detected. The dominance of pigs with *ESR^{BB}*, *PRLR^{AA}*, and *EPOR^{TT}* genotypes by prolificacy and milk producing ability indices over the animals with other genotypes by 7.8–9.3% and 9.0–13.2%, 5.9–20.4% and 10.0–21.0%, 12.4% and 5.4%, respectively, has been established.

Key words: breed, Landrace, Yorkshire, parental form, individual productivity, reproductive qualities, DNA markers.

Дата поступления статьи: 25 января 2019 г.

В.Н. Кипень¹, А.О. Рябцева¹, С.А. Котова¹, Н.В. Журина², А.И. Ганджа², И.С. Цыбовский¹

ОЦЕНКА ИНТРОГРЕССИИ ГЕНОВ СВИНЬИ ДОМАШНЕЙ (*SUS SCROFA DOMESTICUS*) В ГЕНОФОНД ДИКОГО КАБАНА (*SUS SCROFA SCROFA*) НА ОСНОВЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *MC1R* И *NR6A1*

¹Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Филимонова, 25

²Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Фрунзе, 11

Методом ПЦР-ПДРФ исследован полиморфизм генов *MC1R* и *NR6A1* у дикого кабана ($n = 719$) и свиньи домашней ($n = 304$, 6 пород). Уровень интрогрессии «домашних» генов в исследованной выборке дикого кабана по сайту с.367G>A гена *MC1R* составил $6,8 \pm 0,9\%$; по сайту с.729G>A полиморфизм не выявлен. По гену *NR6A1* уровень гибридизации составил $1,5 \pm 0,5\%$. Породы белорусская мясная, ландрас, йоркшир, белорусская крупная белая относятся к свинье домашней типа А (ген *MC1R*). Для 12,5% особей породы дюрок установлен нетипичный для породы тип А. Порода белорусская черно-пестрая на 80% представлена типом А, на 5% — типом В и на 15% — типом А/В. В породах белорусская крупная белая и черно-пестрая выявляются аллели дикого типа, что может свидетельствовать об обратной интрогрессии генов — от дикого кабана к свиньям домашним.

Ключевые слова: гены *MC1R* и *NR6A1*, полиморфизм, интрогрессия, кабан дикий, свинья домашняя, гибридизация.

Введение

Дикий кабан становится ключевым видом многих европейских экосистем по причине стремительного увеличения численности в большинстве стран Европы [1]. Например, в соседней Польше поголовье дикого кабана удвоилось в течение 15 лет — с 118 000 особей в 2000 году до 264 000 особей в 2015 году [2]. В настоящее время этот вид достигает в Европе почти четырех миллионов особей и уже считается вредителем во многих регионах, оказывая влияние не только на экосистемы, но и на местную экономику. Действительно, дикий кабан может вызвать обширные повреждения сельскохозяйственных культур, лесных угодий и растительности пастбищ, а также провоцировать столкновения транспортных средств и другие проблемы в урбанизированных регионах [3, 4].

Домашний аналог дикого кабана — свинья домашняя — считается одним из самых ценных одомашненных животных, имеющих важное экономическое значение. Приручение способствовало появлению новых фенотипических и поведенческих признаков у одомаш-

ненных животных по сравнению с их дикими предками, тем не менее между кабаном и свиньей домашней в Европе сохранилось тесное генетическое сходство [5–8]. Дикий кабан может свободно скрещиваться с домашними свиньями в естественных условиях с рождением плодовитого потомства. В настоящее время интрогрессия генов свиньи домашней в генофонд диких кабанов подтверждена многими исследованиями и не оспаривается [9–11].

Активно обсуждаемыми аспектами остаются количественная оценка уровня интрогрессии «домашних» генов, причины гибридизации, наличие обратного потока генов от диких к домашним животным, физиологические, экологические и т. п. последствия взаимной интрогрессии генов между дикой и домашней формами. Предполагается, что генетическая интрогрессия от домашних свиней в генофонд диких кабанов, показанная рядом авторов [12, 13], может быть причиной возникновения различных поведенческих и физиологических эффектов (например, изменения репродуктивных моделей), поскольку изменяет такие видовые характери-

стики дикого кабана, как скорость размножения и его иммунные реакции [10, 11].

В условиях отсутствия естественных хищников основным фактором, сдерживающим рост численности кабана, является охота. Незаконная охота, в том числе на кабана, относится к правонарушениям, за которые субъекты незаконной охоты несут административную, уголовную и иную ответственность в соответствии с законодательными актами. При этом с неизбежностью должен быть установлен сам факт добычи дикой (свободно живущей) особи, что в условиях повсеместного распространения мясопродуктов из свиньи домашней представляет непростую задачу для судебных экспертов. Для генов *MCR1* и *NR6A1* ранее было показано наличие устойчивых различий между дикими и домашними формами кабана, что позволяет использовать их как ДНК-маркеры при дифференциации биологических образцов дикого кабана и домашней свиньи [14].

В данной работе проведено сравнительное исследование полиморфизма генов *MCR1* и *NR6A1* в популяциях дикого кабана и в выборках пород свиньи домашней, обитающих/разводимых на территории Республики Беларусь. Прикладной задачей исследования являлось выявление молекулярных различий данных генов, достаточных для дифференциации биологических образцов свиней по типу «дикий»/«домашний», в ходе их судебно-экспертного исследования в Республике Беларусь.

Ген *MC1R* (the melanocortin-1 receptor, NCBI Gene ID 494018), отвечающий за выработку меланина, у дикого кабана и свиньи домашней хорошо изучен на молекулярном уровне. Было показано, что фенотипическое проявление основных идентифицированных аллелей гена *MC1R* связано с различной окраской волосяного покрова и кожи животных (черной, пятнистой, рыжей); анализ последовательности гена позволил выявить несколько дополнительных аллельных вариантов [15].

Дикий тип аллелей гена *MC1R* идентифицируется исключительно у диких кабанов, в то время как у свиней домашних имеются другие варианты аллелей, отличные от дикого типа [16].

Другим признаком, который отличает диких кабанов и европейские промышленные породы свиней, является число позвонков: 19 у кабана и 21–23 у представителей современ-

ных пород. Мутантный аллель гена *NR6A1* (the nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1, NCBI Gene ID 100038028) обнаружен у большинства европейских промышленных пород свиней, тогда как в популяции диких кабанов выявляется только аллель дикого типа.

Гены *MC1R* и *NR6A1* влияют на фенотипически выраженные признаки — цвет шерсти и количество позвонков у *Sus scrofa*, соответственно, в связи с чем оба гена были подвергнуты длительному жесткому отбору как во время приручения, так и в природе. Например, маскировочный окрас в естественной среде обеспечивал большие шансы на выживание [15, 17].

Материалы и методы

Исследование полиморфизма генов *MC1R* и *NR6A1* у дикого кабана проводили на основе коллекционных образцов мышечной и/или хрящевой ткани животных. Коллекция образцов диких животных была сформирована в осенне-зимние охотничьи сезоны 2010–2011 гг. при содействии Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь, Республиканского государственного общественного объединения «Белорусское общество охотников и рыболовов» и Государственной инспекции охраны животного и растительного мира при Президенте Республики Беларусь во исполнение поручения Совета министров № 06/226-189 от 07 июня 2010 г. Выборка диких кабанов представляла собой в общей сложности 719 образцов из различных регионов Республики Беларусь (рис. 1).

Коллекция образцов ДНК свиньи домашней ($n = 304$, 6 пород: белорусская крупная белая, белорусская мясная, белорусская черно-пестрая, йоркшир, ландрас, дюрок) предоставлена РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству».

ДНК из образцов мышечной и хрящевой ткани диких кабанов выделяли по общепринятой методике, основанной на высвобождении нуклеиновых кислот в ходе инкубации образцов при 37 °C в течение 18–20 часов в лизирующем буфере, содержащем 2% додецилсульфата натрия (SDS), 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, pH 7,5 и протеиназу K в конечной концентрации 50 мкг/мл. Очистку препарата ДНК проводили с использованием силикагеля по методике, описанной в работе Boom R и др. [18].

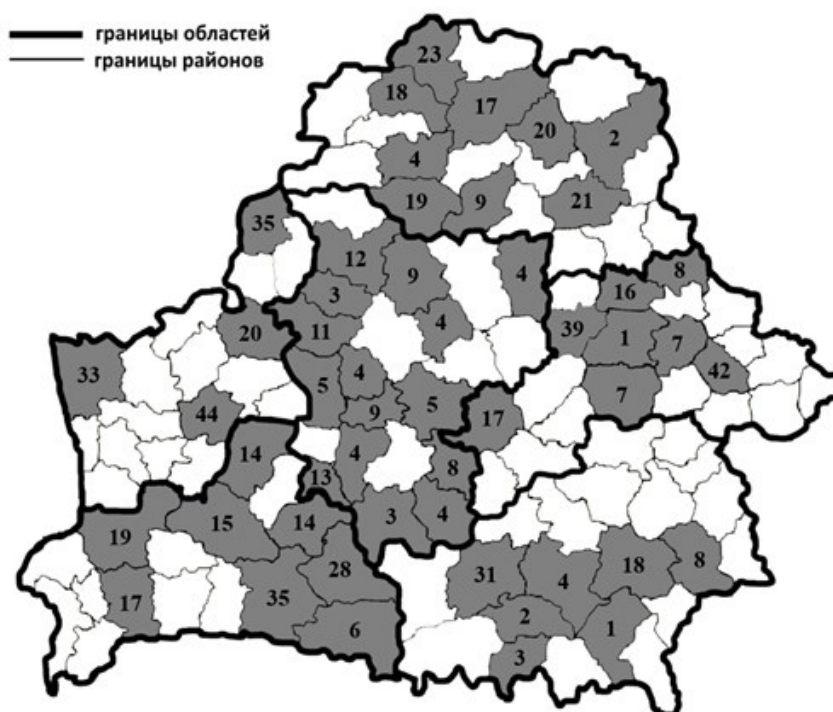


Рис. 1. Места сбора образцов дикого кабана (административные районы); цифрами обозначено количество исследованных образцов кабана

Дифференциацию биологических образцов по происхождению от диких или домашних особей кабана проводили на основе различий длин фрагментов, полученных при рестрикции продуктов амплификации генов *MC1R* или *NR6A1* (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов, ПЦР-ПДРФ) [14].

Для амплификации участков генов *MC1R* и *NR6A1* использовали 10 мМ Трис-НСl буфер pH 8,8, содержащий 50 мМ KCl, 0,08% Nonidet P40, 3,0 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), 0,08 мкМ каждого из пары праймеров, 0,2 ед. SynTaq-полимеразы (ООО «Синтол», РФ) и 10 нг ДНК; конечный объем смеси составил 15 мкл. Реакцию проводили в контролируемых температурных условиях на термоциклере iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) в следующем режиме: инициальная денатурация — 95 °С, 15 с; амплификация — 35 циклов [денатурация 95 °С, 5 с; отжиг праймеров 56 °С, 20 с, элонгация 72 °С, 40 с]; финальная элонгация — [72 °С, 300 с]. Эффективность ПЦР контролировали гелем электрофорезом в 2,0% агарозном геле.

В работе использовали олигонуклеотиды, смоделированные при помощи онлайн-серви-

са NCBI/Primer-BLAST® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Информация об условиях экспериментального исследования полиморфных вариантов генов *MC1R* и *NR6A1* методом ПЦР-ПДРФ представлена в табл. 1.

Реакцию рестрикции проводили в трех отдельных пробирках с использованием эндонуклеазы рестрикции BspHI для сайта с.367G>A гена *MC1R*, эндонуклеазы рестрикции BstUI для сайта с.729G>A гена *MC1R* и эндонуклеазы рестрикции MspI для сайта g.299084751C>T гена *NR6A1* согласно протоколам производителя (Thermo Scientific Fermentas, EU — для BspHI и BstUI; NEB, США — для MspI) с модификациями при 37 °С в течение 2 часов. Регистрацию результатов рестрикции осуществляли путем разделения полученных фрагментов в 8% полиакриламидном геле в течение 1,5–2,5 часов при постоянном напряжении 220 В с последующей детекцией флуоресценции комплекса ДНК с интеркалирующим красителем (бромистый этидий) в ультрафиолетовом свете.

Статистический анализ был проведен с использованием программы SPSS v.20.0 (IBM, США). С помощью критерия χ^2 было определено соответствие частот встречаемости аллелей закону Харди-Вайнберга.

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидов для амплификации участков генов *MC1R* и *NR6A1*, ферменты и диагностируемые генотипы

Ген, полиморфизм	Последовательность олигонуклеотида 5'>3'	T _m , °C	Эндонуклеаза рестрикции	Диагностируемые генотипы (фрагменты рестрикции, п. н.)
<i>MC1R</i> с.367G>A	F: 5'-TACTACTTCGTCTGCTGCCT-3' R: 5'-GCGCGTAGAAGATGGACAC-3'	58,16 58,71	BspHI	GG (229) GA (90,139,229) AA (90,139)
<i>MC1R</i> с.729 G>A	F: 5'-TCATCGCCTACTACCACCAC-3' R: 5'-AGATGACGAGGGCCAGAAAG-3'	58,89 59,46	BstUI	GG (147,183) GA (147,183,330) AA (330)
<i>NR6A1</i> g.299084751C>T	F: 5'-AGGATTATGTCTGGGCAGGA-3' R: 5'-GTGATCCCTAGATGACCCCT-3'	57,80 57,59	MspI	CC (66,113) CT (66,113,179) TT (179)

Результаты и обсуждение

Проблема дифференциации биологических образцов диких и домашних свиней первоначально вытекала из необходимости контроля качества мясopодуKтов. Мясо дикого кабана по своим свойствам (низкое содержание жиров, большее количество полиненасыщенных жирных кислот, отсутствие гормонов и антибиотиков и т. д.) относится к деликатесной продукции, в связи с чем возникает интерес в подмене его более дешевым мясом свиньи домашней [14, 16]. Обеспечение здоровой и безопасной продукции и борьба с мошенничеством требовала разработки методик контроля, которые, как оказалось, позволяют изучать природные процессы фундаментального характера.

В настоящее время исследования процесса гибридизации дикой и домашней форм кабана проведены во многих странах, поскольку становится понятен масштаб экономических и управленческих последствий, сопутствующих гибридизации внутри вида *Sus scrofa*. Методические подходы для дифференциации биологических образцов диких и домашних свиней экспериментально обоснованы и не представляют сложности.

Дифференциацию биологических образцов на «дикие» или «домашние» проводили методом ПЦР-ПДРФ, как описано в работе [14], с модификацией: смоделированные нами праймеры позволяли получать исходные ампликоны и рестрикты с удобными для анализа размерами (табл. 1). Типичные результаты ре-

стрикции ампликона гена *MC1R* эндонуклеазами рестрикции BstUI для сайта с.729G>A и BspHI для сайта с.367G>A у различных представителей вида Кабан приведены на рис. 2.

Коллекция образцов дикого кабана формировалась в 2010–2011 годах, когда популяция дикого кабана, обитающая на территории Беларуси, находилась на пике численности. Формирование коллекций проводили с учетом наличия в том или ином регионе лесных массивов как среды обитания дикого кабана (рис. 1). Суммарно в Гомельской области отобрано 67 образцов дикого кабана, в Минской области — 98 шт., в Витебской области — 133 шт., в Могилевской области — 141 шт., в Гродненской области — 132 шт., в Брестской области — 148 шт.

В результате генотипирования 719 образцов дикого кабана по полиморфным сайтам с.367G>A и с.729G>A гена *MC1R* и сайту g.299084751C>T гена *NR6A1* были получены результаты, представленные в табл. 2.

В общем итоге в коллекции из 719 образцов дикого кабана для полиморфного варианта гена *MC1R* с.367G>A установлено наличие только двух генотипов — GG и GA. При этом аллель «G» в данной выборке является мажорным и встречается с частотой 96,6%. Из 719 образцов дикого кабана для 49 особей в полиморфном сайте с.367G>A был определен генотип GA — профиль, характерный для гибридов дикого кабана и свиньи домашней типа А. Распределение гибридных особей по территории республики приведено в табл. 3.

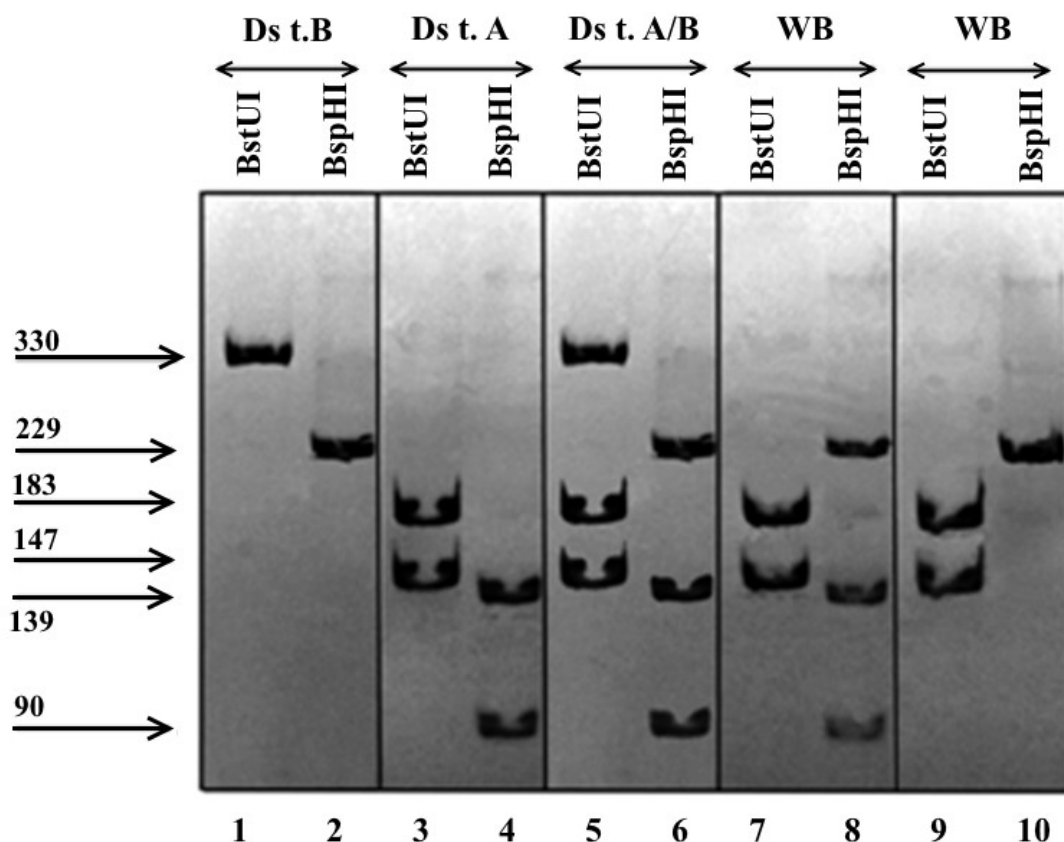


Рис. 2. Электрофоретическое разделение рестриктв гена *MC1R* для пяти выявленных генотипов: свинья домашняя, тип В; свинья домашняя, тип А; гибрид свинья домашняя, тип А / свинья домашняя, тип В; гибрид дикий кабан/ свинья домашняя типа А; дикий кабан

1,2 — свинья дом. тип В: 1 — рестриктаза BstUI (330 п. н.); 2 — рестриктаза BspHI (229 п. н.); 3,4 — свинья дом. тип А: 3 — рестриктаза BstUI (147/183 п. н.); 4 — рестриктаза BspHI (90/139 п. н.); 5,6 — гибрид свинья дом. тип А/ свинья дом. тип В, 5 — рестриктаза BstUI (147/183/330 п. н.); 6 — рестриктаза BspHI (90/139/229 п. н.); 7,8 — гибрид дикий кабан/ свинья дом. тип А; 7 — рестриктаза BstUI (147/183 п. н.); 8 — рестриктаза BspHI (90/139/229 п. н.); 9,10 — дикий кабан, 9 — рестриктаза BstUI (147/183 п. н.); 10 — рестриктаза BspHI (229 п. н.)

Таблица 2

Результаты исследования полиморфизма генов *MC1R* и *NR6A1* в выборке дикого кабана

Генотипы	Полиморфный сайт		
	Ген <i>MC1R</i>		Ген <i>NR6A1</i>
	с.367G>A	с.729G>A	g.299084751C>T
Ген <i>MC1R</i>			
GG	670 (93,2%)	719 (100%)	
GA	49 (6,8%)	—	
AA	—	—	
аллель			
G	96,6%	100%	
A	3,4%	—	

Продолжение табл. 2

Генотипы	Полиморфный сайт		
	Ген <i>MC1R</i>		Ген <i>NR6A1</i>
	с.367G>A	с.729G>A	g.299084751C>T
Ген <i>NR6A1</i>			
СС			708 (98,47%)
СТ			7 (0,097%)
ТТ			4 (0,056%)
аллель			
С			99,0%
Т			1,0%

Таблица 3

Распределение гибридных особей с генотипом с.367_GA (*MC1R*) по областям республики

Область	Кол-во образцов, шт.	Кол-во особей с генотипом с.367_GA, шт.	Частота особей с генотипом с.367_GA, %
Минская	98	5	5,1
Витебская	133	8	6,0
Гродненская	132	8	6,1
Брестская	148	10	6,8
Могилевская	141	12	8,5
Гомельская	67	6	9,0
Всего	719	49	6,8

Для полиморфного сайта с.729G>A у дикого кабана показано наличие только одного генотипа — GG. Следует отметить, что в белорусской популяции кабанов также не выявлен полиморфизм в позиции с.727G>A данного гена, как это показано для диких кабанов севера Италии [14]. При наличии замены в позиции с.727G>A ПЦР-продукт гена *MC1R* 330 п. н. не будет расщепляться эндонуклеазой BstUI (тетрануклеотидный сайт узнавания CG↓CG), как это бывает у свиньи домашней типа В. В результате исследования для всех животных из коллекции диких кабанов в сайте с.729G>A были установлены генотипы GG, типичные для дикой формы Кабана.

Распределение генотипов для полиморфных вариантов с.367G>A соответствовало равно-

весию Харди-Вайнберга (Hardy–Weinberg equilibrium) — уровень статистической значимости равен $p = 0,34$.

По полиморфному сайту g.299084751C>T гена *NR6A1* в результате генотипирования 719 образцов дикого кабана для 11 особей был определен аллель «Т», характерный для свиней домашних. При этом аллель «С» распространен в данной выборке с частотой 99,0%, т. е. является мажорным.

Основные результаты исследований диких кабанов в Европе обобщены в табл. 4.

Наличие свободно живущих особей, гибридных по гену *MC1R*, показано для всех стран. По литературным данным, для таких стран, как Испания, Люксембург, Португалия, Румыния,

Таблица 4

Результаты исследования полиморфизма генов *MC1R* и *NR6A1* в выборках диких кабанов в странах Европы

Географическое происхождение образцов	Кол-во образцов	Распределение генотипов			Ссылка на исследование
		<i>MC1R</i> с.367G>A	<i>MC1R</i> с.729G>A	<i>NR6A1</i> g.299084751C>T	
Беларусь	719	GG (670/719) AG (49/719)	GG (719/719)	CC (708/719) CT (7/719) TT (4/719)	Собственные исследования
Болгария	291	GG (245/291) AG (33/291) AA (13/291)	GG (291/291)	—	[19]
Италия	62	GG(59/62) AG (2/62) AA (1/62)	GG (62/62)	—	[20]
Греция	119	GG (113/119) AG (6/119)	GG (113/113)	—	[12]
Польша	265	GG (200/265) AG (59/265) AA (6/265)	GG (265/265)	—	[2]
Италия	111	GG (97/111) AG (14/111)	GG (104/111) AG (7/111)	CC (107/111) CT (4/111)	[14]
Словения, запад. часть Балканского пол-ва	90	GG (67/90) AG (22/90) AA (1/90)	GG (90/90)	CC (79/90) CT (10/90) TT (1/90)	
Италия	33	GG (33/33)	GG (33/33)	CC (29/33) CT (4/33)	[21]
Сардиния, Италия	21	GG (18/21) AG (1/21) AA (2/21)	GG (21/21)	CC (21/21)	

Франция, Хорватия и Швеция экспериментально наличие гибридных особей не подтверждено или выявлены единичные гибридные особи [16, 21], однако это скорее следствие незначительных объемов исследованных выборок (от 6 до 15 особей).

В работе Сани А. [21] при исследовании 10 образцов из Беларуси установлены 2 особи гибридного происхождения (т. е. 20% от исследованных). Однако результаты наших исследований не подтверждают такой высокий уровень интрогрессии генов свиней домашних в генофонд диких кабанов в Беларуси. При среднем значении уровня интрогрессии по сайту с.367G/A гена *MC1R*, равном $6,8 \pm 0,9\%$, наибольшее количество гибридов (GA)

отмечено в Гомельской области (9,0%), наименьшее — в Минской области (5,1%). Проведенным исследованием установлено, что популяция диких кабанов ($n = 719$) включает 49 гибридных особей, причем все гибридные особи (генотип GA) происходят от свиньи домашней типа А.

Результаты исследований полиморфизма гена *MC1R* в различных странах иллюстрирует рис. 3 (показаны результаты исследований, в которых $n \geq 20$).

Таким образом, уровень интрогрессии «домашнего» аллеля гена *MC1R* в генофонд дикого кабана, обитающего на территории Республики Беларусь, сопоставим с таковым для Греции [12] — менее 8%.

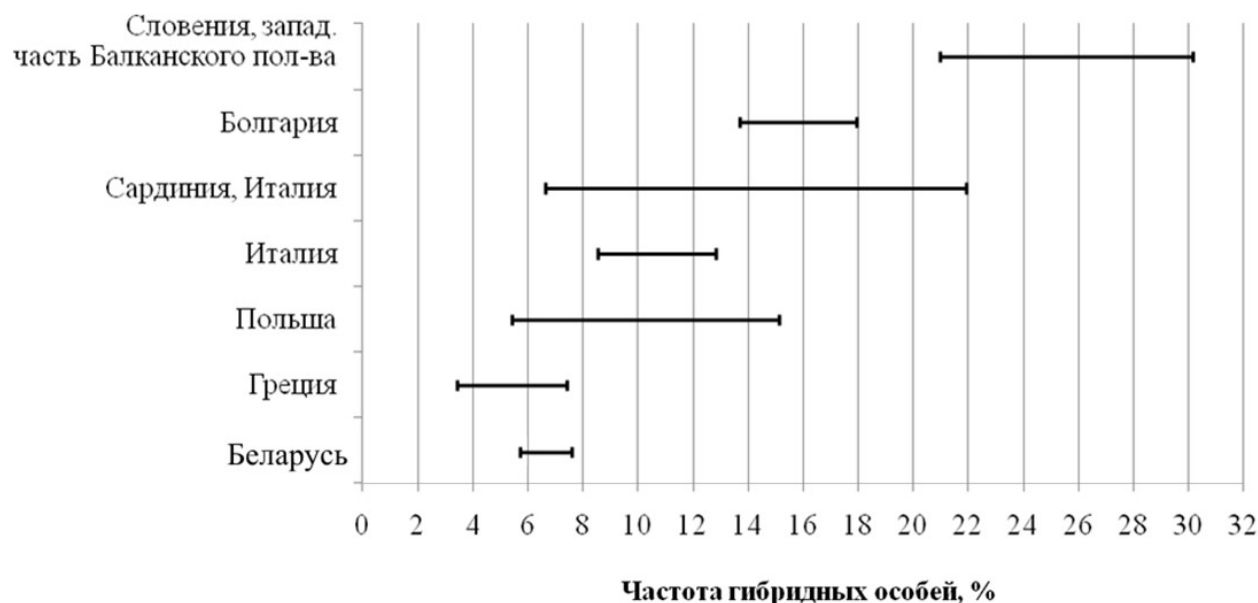


Рис. 3. Доля (в %) гибридных особей среди популяций дикого кабана по гену *MC1R*; указан диапазон значения 95% доверительного интервала для расчетных значений

Уровень интрогрессии «домашних» аллелей в популяцию дикого кабана по гену *NR6A1* на территории Республики Беларусь составляет $1,5 \pm 0,5\%$. Наибольшее значение зафиксировано в Гродненской области (3,0%), а в Витебской и Гомельской областях для всех особей установлен только «дикий» генотип СС. Появление «домашнего» генотипа (ТТ) у 4 особей диких кабанов, скорее всего, является результатом скрещивания свободно живущих гибридных особей (F_2 , F_3 и т. п.) и не связано с одичанием особей свиньи домашней.

Распределение частот генотипов по сайту g.299084751C>T гена *NR6A1* не соответствовало равновесию Харди-Вайнберга (HWe), однако установленные в выборке диких кабанов частоты аллелей — С (99%), Т (1,0%) — не позволяют с уверенностью отнести данный сайт к категории полиморфных.

Ввиду незначительного количества работ, посвященных оценке гибридизации по гену *NR6A1*, диапазоны интрогрессии в данном гене не поддаются критическому анализу. Только для двух стран — Словении ($n = 90$, включая западную часть Балканского полуострова) и Италии ($n = 144$) — показано, что уровни гибридизации находятся в диапазоне $12,2 \pm 3,5\%$ и $5,6 \pm 1,9\%$ соответственно [14, 21].

Соотношение уровней гибридизации по гену *MC1R* и гену *NR6A1* по результатам исследований диких кабанов в трех станах (регионах)

с относительно большими объемами анализируемых выборок приведены на рис. 4.

При исследовании полиморфизма генов *MC1R* и *NR6A1* у свиньи домашней получены следующие результаты (табл. 5).

Исходя из номенклатуры Fajardo V. и др. [16], для свиньи домашней типа А характерен генетический профиль — с.367AA / с.729GG; а для свиньи типа В — с.367GG / с.729AA.

Для пород белорусская мясная, ландрас и йоркшир показаны генотипы свиньи домашней типа А (сайты с.367G>А и с.729G>А гена *MC1R*). Для 49 из 50 животных породы белорусская крупная белая, т. е. в 98% случаев, также показан генетический профиль, характерный для свиньи домашней типа А. По гену *NR6A1* генотипы свиньи домашней (ТТ) по сайту g.299084751C>T гена *NR6A1* установлены для 5 пород (белорусская мясная, дюрок, белорусская черно-пестрая, ландрас, йоркшир); гибридная форма (СТ) выявлена только у представителей породы белорусская крупная белая (6%, 3/50).

Однако для пород дюрок и белорусская черно-пестрая по гену *MC1R* выявлено более разнообразное сочетание генотипов. Так, для 9 особей (12,5%) породы дюрок был показан генетический профиль, характерный для свиньи домашней типа А, для 62 (86%) — характерный для свиньи домашней типа В, и для одного животного — характерный для дикого

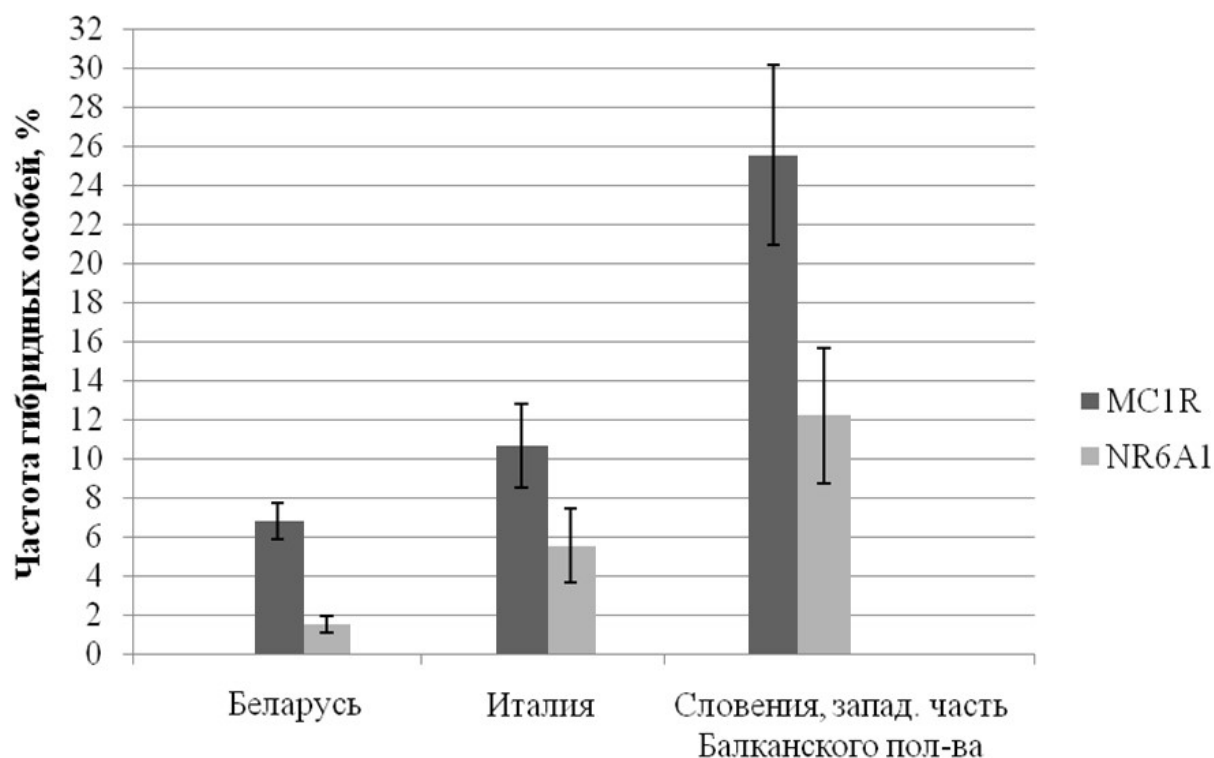


Рис. 4. Распространенность гибридных особей дикого кабана в зависимости от полиморфизма генов *MC1R* и *NR6A1* (по данным [14, 21])

Таблица 5

Результаты исследования полиморфизма генов *MC1R* и *NR6A1* в выборке домашних свиней

Порода домашней свиньи	Ген <i>MC1R</i>			Ген <i>NR6A1</i>	
	Генотип/аллель	Сайт с.367G>A	Сайт с. 729G>A	Генотип/аллель	Сайт g.299084751C>T
Белорусская крупная белая, n = 50	GG	–	49 (98,0%)	CC	–
	GA	–	1 (2,0%)	CT	3 (6,0%)
	AA	50 (100%)	–	TT	47 (94,0%)
	аллель G	–	99,0%	аллель C	3,0%
	аллель A	100%	1,0%	аллель T	97,0%
Белорусская мясная, n = 53	GG	–	53 (100%)	CC	–
	GA	–	–	CT	–
	AA	53 (100%)	–	TT	53 (100%)
	аллель G	–	100%	аллель C	–
	аллель A	100%	–	аллель T	100%
Белорусская черно-пестрая, n = 20	GG	1 (5,0%)	18 (90,0%)	CC	–
	GA	3 (15,0%)	–	CT	–

Продолжение табл. 5

Порода домашней свиньи	Ген <i>MC1R</i>			Ген <i>NR6A1</i>	
	Генотип/аллель	Сайт с.367G>A	Сайт с. 729G>A	Генотип/аллель	Сайт g.299084751C>T
Белорусская черно-пестрая, n = 20	AA	16 (80,0%)	2 (10,0%)	ТТ	20 (100%)
	аллель G	12,5%	90,0%	аллель С	—
	аллель А	87,5%	10,0%	аллель Т	100%
Дюрок, n = 72	GG	63 (87,5%)	10 (13,9%)	СС	—
	GA	—	—	СТ	—
	AA	9 (12,5%)	62 (86,1%)	ТТ	72 (100%)
	аллель G	87,5%	13,9%	аллель С	—
	аллель А	12,5%	86,1%	аллель Т	100%
Ландрас, n = 54	GG	—	54 (100%)	СС	—
	GA	—	—	СТ	—
	AA	54 (100%)	—	ТТ	54 (100%)
	аллель G	—	100%	аллель С	—
	аллель А	100%	—	аллель Т	100%
Йоркшир, n = 55	GG	—	55 (100%)	СС	—
	GA	—	—	СТ	—
	AA	55 (100%)	—	ТТ	55 (100%)
	аллель G	—	100%	аллель С	—
	аллель А	100%	—	аллель Т	100%

кабана (с.367 GG, с.729 GG). Американская порода дюрок приобретена для селекционных целей и выявление в поголовье данной породы 9 особей с генотипом, характерным для свиньи домашней типа А, противоречит литературным данным [2, 14, 22]. Тот факт, что все особи с генотипами, нетрадиционными для породы дюрок, происходят из одного хозяйства, позволяет предположить, что нетипичные для породы дюрок генотипы являются следствием неконтролируемого скрещивания особей породы дюрок со свиньями типа А: дальнейшее скрещивание гибридных потомков (F_1 , F_2 и т. д.) привело к формированию спектра выявленных генотипов. Вероятность образования «дикого» генотипа с.367GG,

с.729GG у домашней свиньи также возможна при скрещивании особей домашних свиней типов А и В между собой. Однако не исключен и эффект основателя в случае, если в результате закупки изначально была поставлена партия свиней породы дюрок, включающая особей с нетипичными генотипами.

Для породы белорусская черно-пестрая распределение животных по типам А и В имело следующий вид: 16 особей (80%) — тип А, 1 (5%) — тип В, 3 (15%) — тип А/В. В отличие от промышленных пород домашних свиней, порода белорусская черно-пестрая выведена путем спонтанного скрещивания местных пород с зарубежными, поэтому частично представляет народную селекцию свиньи до-

машней. Сложная композиция генотипов, выявленных у данной породы, может представлять след обратной интрогрессии генов — от дикого кабана к свиньям домашним. Возможность такого варианта гибридизации подтверждает выявление в группе особей промышленной породы белорусская крупная белая трех особей с «гибридным» генотипом СТ в сайте g.299084751C>T (ген *NR6A1*), поскольку аллель «С» имеется только у дикого кабана.

Действительно, основной моделью интрогрессии «домашних» генов в генофонд дикого кабана считается гибридизация при полусвободном содержании домашних свиней, обеспечивающая возможность прямого контакта между дикими и домашними формами [2, 3, 8]. Адекватность такой модели подтверждают более высокие уровни интрогрессии в странах с мягким климатом. Например, для региона юго-восточной Европы (Словения и Западные Балканы), итальянской Сардинии и др. [14, 21]. Даже среди белорусских популяций дикого кабана выявляется тенденция к увеличению количества гибридов с севера на юг.

В последнее время показано, что значительный поток «домашних» генов в генофонд дикого кабана, хотя и локального характера, обеспечивает другая тенденция. В ряде работ отмечены факты преднамеренной гибридизации дикого кабана со свиньями при загонном содержании диких кабанов как объекта охоты или источника деликатесной продукции. Как правило, преднамеренное скрещивание проводится с целью получения «улучшенного» дикого кабана, с увеличенными плодовитостью и скоростью роста, что в ряде стран запрещено законодательно [2, 9, 11, 12]. Экспериментально показано, что уровень «домашних» генов у диких кабанов с загонным содержанием в ряде случаев значительно выше, чем в соседних популяциях свободно живущих диких животных.

Дополнительно нами было проведено исследование полиморфизма микросателлитных локусов всех 304 домашних свиней и 719 образцов дикого кабана (16 STR-локусов) и определены частоты аллелей в трех группах: у свиней домашних, у свободно живущих гибридных особей ($n = 49$) и у кабанов, несущих дикий тип гена *MC1R* [23]. Установлено, что распределение частот аллелей микросателлитных локусов у домашних свиней и диких ка-

банов достоверно различается, в то время как в гибридной и негибридной группах свободно живущих кабанов никаких различий не наблюдается. При оценке межгрупповой дифференциации (AMOVA) никаких следов дифференциации между дикими кабаном, несущими дикий тип гена, и кабаном с аллелями свиней домашних в гене *MC1R* не выявлено. Таким образом, в настоящее время естественная гибридизация между дикой и домашней формами кабана на территории Беларуси, скорее всего, не происходит, что подтверждается отсутствием статистических различий в аллельном спектре 16 микросателлитных локусов у гибридных и «чисто диких» групп животных.

Заключение

Показано, что популяции диких кабанов, обитающих на территории Беларуси, несут гены свиней домашних. Уровень интрогрессии «домашних» генов в генофонд диких кабанов составляет $6,8 \pm 0,9\%$ для гена *MCR1* и $1,5 \pm 0,5\%$ для гена *NR6A1*, что значительно меньше, чем в популяциях диких кабанов из Центральной и Южной Европы или соседней Польши. Таким образом, дикие кабаны в Беларуси на пике численности в 2010–2011 годах в большей степени сохранили первоначальный «дикий» генофонд.

В генофонде пород белорусская крупная белая и белорусская черно-пестрая выявляется примесь аллелей дикого типа, что может служить указанием на существование обратного потока генов от диких кабанов к свиньям домашним. Исследование полиморфизма 16 микросателлитных локусов показано отсутствие дифференциации между гибридными и негибридными свободно живущими особями дикого кабана, что указывает на отсутствие естественной гибридизации диких и домашних животных в ближайшем временном интервале. Развитие промышленного свиноводства с параллельной депопуляцией сельского населения минимизировали возможность контактов диких и домашних свиней, а массовый отстрел диких кабанов на фоне вспышки африканской чумы свиней в 2012–2013 годы резко снизил численность дикого кабана. В настоящее время для Беларуси более вероятным представляется миграционная модель поступления «домашних» генов [2], поскольку неоднократно

отмечена миграция стад диких кабанов с территории сопредельных государств, и при этом показано, что уровень интрогрессии «домашних» генов в генофонд диких кабанов в странах Европы существенно выше, чем в Беларуси.

Список использованных источников

1. Massei, G. Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe: wild boar and hunter trends in Europe / G. Massei [et al.] // *Pest Manag. Sci.* — 2015. — Vol. 71, № 4 — P. 492–500.
2. Dzialuk, A. High domestic pig contribution to the local gene pool of free-living European wild boar: a case study in Poland / A. Dzialuk [et al.] // *Mammal Res.* — 2018. — Vol. 63, № 1 — P. 65–71.
3. Geisser, H. Efficacy of hunting, feeding, and fencing to reduce crop damage by wild boars / H. Geisser, H.-U. Reyer // *J. Wildl. Manag.* — 2004. — Vol. 68, № 4 — P. 939–946.
4. Massei, G. Too many hogs? A review of methods used to mitigate impact by wild boar and feral hogs. / G. Massei, S. Roy, R. Bunting // *Human-wildlife Interact.* — 2011. — № 5 — P. 79–99.
5. Larson, G. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe / G. Larson // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* — 2007. — Vol. 104. — P. 15276–15281.
6. Luetkemeier, ES. Multiple Asian pig origins revealed through genomic analyses / ES. Luetkemeier // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* — 2010. — Vol. 54. — P. 680–686.
7. Ramirez, O. Integrating Y-Chromosome, Mitochondrial, and Autosomal Data to Analyze the Origin of Pig Breeds / O. Ramirez [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* — 2009. — Vol. 26, № 9 — P. 2061–2072.
8. Scandura, M. Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable? / M. Scandura [et al.] // *Mol. Ecol.* — 2008. — Vol. 17, № 7 — P. 1745–1762.
9. Frantz, A.C. Genetic evidence for introgression between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Belgium and Luxembourg: a comparative approach with multiple marker systems: Introgression Between Pigs and Boars / A.C. Frantz [et al.] // *Biol. J. Linn. Soc.* — 2013. — Vol. 110, № 1 — P. 104–115.
10. Goedbloed, D.J. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals recent genetic introgression from domestic pigs into Northwest European wild boar populations: Introgression in wild boar / D.J. Goedbloed [et al.] // *Mol. Ecol.* — 2013. — Vol. 22, № 3 — P. 856–866.
11. Goedbloed, D.J. Reintroductions and genetic introgression from domestic pigs have shaped the genetic population structure of Northwest European wild boar / D.J. Goedbloed [et al.] // *BMC Genet.* — 2013. — Vol. 14, № 1 — P. 43.
12. Koutsogiannouli, E.A. Detection of hybrids between wild boars (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pigs (*Sus scrofa f. domestica*) in Greece, using the PCR-RFLP method on melanocortin-1 receptor (MC1R) mutations / E.A. Koutsogiannouli [et al.] // *Mamm. Biol. — Z. Für Säugetierkd.* — 2010. — Vol. 75, № 1 — P. 69–73.
13. Scandura, M. Effects of human perturbation on the genetic make-up of an island population: the case of the Sardinian wild boar / M. Scandura [et al.] // *Heredity.* — 2011. — Vol. 106, № 6 — P. 1012–1020.
14. Fontanesi, L. Differentiation of meat from European wild boars and domestic pigs using polymorphisms in the MC1R and NR6A1 genes / L. Fontanesi [et al.] // *Meat Sci.* — 2014. — Vol. 98, № 4 — P. 781–784.
15. Fang, M. Contrasting Mode of Evolution at a Coat Color Locus in Wild and Domestic Pigs / M. Fang [et al.] // *PLoS Genet.* — 2009. — Vol. 5, № 1 — P. e1000341.
16. Fajardo, V. Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes / V. Fajardo [et al.] // *Meat Sci.* — 2008. — Vol. 78, № 3 — P. 314–322.
17. Li, J. Artificial selection of the melanocortin receptor 1 gene in Chinese domestic pigs during domestication / J. Li [et al.] // *Heredity.* — 2010. — Vol. 105, № 3 — P. 274–281.
18. Boom, R. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 1990. — Vol. 28, № 3 — P. 495–503.
19. Nikolov, I.S. Population genetic structure of wild boar *Sus scrofa* in Bulgaria as revealed

- by microsatellite analysis / I.S. Nikolov [et al.] // Acta Theriol. (Warsz.). — 2009. — Vol. 54, № 3 — P. 193–205.
20. Fulgione, D. Unexpected but welcome. Artificially selected traits may increase fitness in wild boar / D. Fulgione [et al.] // Evol. Appl. — 2016. — Vol. 9, № 6 — P. 769–776.
21. Canu, A. Lack of polymorphism at the MC1R wild-type allele and evidence of domestic allele introgression across European wild boar populations / A. Canu [et al.] // Mamm. Biol. — Z. Für Säugetierkd. — 2016. — Vol. 81, № 5 — P. 477–479.
22. Dun, G. Variations of Melanocortin Receptor 1 (MC1R) Gene in Three Pig Breeds / G. Dun [et al.] // J. Genet. Genomics. — 2007. — Vol. 34, № 9 — P. 777–782.
23. Rebala, K. STR Profiling for Discrimination between Wild and Domestic Swine Specimens and between Main Breeds of Domestic Pigs Reared in Belarus / K. Rebala [et al.] // PLOS ONE. — 2016. — Vol. 11, № 11 — P. e0166563.

V.N. Kipen¹, A.O. Rabcava¹, S.A. Kotava¹, N.V. Zhurina², A.I. Handza², I.S. Tsybovsky¹

POLYMORPHISM ANALYSIS OF *MC1R* AND *NR6A1* GENES TO EVALUATE THE LEVEL OF INTROGRESSION OF DOMESTIC SWINE (*SUS SCROFA DOMESTICUS*) GENES IN WILD BOAR (*SUS SCROFA SCROFA*) POPULATION

¹Scientific and Practical Centre of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus
Minsk, 220114, the Republic of Belarus

²Scientific and Practical Centre for Animal Breeding, NAS of Belarus
Zhodino, 222160, the Republic of Belarus

MC1R and *NR6A1* genes' polymorphism was studied in wild boar (n = 719) and domestic swine (n = 304, 6 breeds) using the PCR-RFLP method. The introgression level of “domestic” alleles in wild boar samples in the c.367G/A site of the *MC1R* gene was 6.8±0.9%; no polymorphism was identified in the c.729G>A site. The hybridization level was 1.5±0.5% by the *NR6A1* gene. Belarusian Meat, Landrace, Yorkshire and Belarusian Large White breeds belong to the domestic swine of type A according to their genotype (*MC1R* gene). For 12.5% of Duroc breed individuals, type A not typical for the breed was established. 80% of the Belarusian Black Pied breed is represented by type A, 5% by type B and 15% by type A/B. Wild type alleles were detected in Belarusian Large White and Belarus Black Pied breeds suggesting the reverse allelic introgression of genes from wild boar to domestic swine.

Key words: *MC1R* gene, *NR6A1* gene, polymorphism, introgression, wild boar, domestic pig, hybridization.

Дата поступления статьи: 30 ноября 2018 г.

А.Н. Щаюк¹, Е.П. Михаленко¹, М.О. Малышева¹, М.Н. Шепетько², В.Г. Лебецкий³, В.И. Литохин⁴,
А.В. Кильчевский¹

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: anna.shchayuk@tut.by

²Белорусский государственный медицинский университет
Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83

³Минское городское патологоанатомическое бюро
Республика Беларусь, 220045, г. Минск, ул. Семашко, 8/ 8

⁴Минский городской клинический онкологический диспансер
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, пр-т Независимости, 64

С использованием технологии секвенирования нового поколения у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), проживающих на территории Беларуси, проведен анализ нарушений в 48 генах и получены данные о молекулярных особенностях двух основных гистологических типов рака легкого — плоскоклеточного рака (ПКРЛ) и аденокарциномы (АК). Сравнительный анализ спектра мутаций в опухоли пациентов с ПКРЛ и АК показал существенную разницу их молекулярного профиля: у пациентов с АК преобладают мутации в генах, кодирующих компоненты RAS/RAF/MAPK-киназного сигнального пути, а у пациентов с ПКРЛ — мутации в генах, кодирующих компоненты P53/Rb-сигнального пути и PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, секвенирование нового поколения, плоскоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого.

Введение

Рак легкого — одно из самых распространенных злокачественных новообразований, являющееся лидирующей причиной смерти от злокачественных новообразований у мужчин, в последнее время возрастает заболеваемость женщин. Немелкоклеточный рак легкого составляет 85% от всех типов рака легкого. Основными гистологическими типами НМРЛ являются плоскоклеточный рак (45–65%), аденокарцинома (30–45%), крупноклеточный (5–10%), смешанный тип (до 5%). В связи с развитием персонализированного подхода к лечению пациентов большое значение имеют исследования молекулярно-генетических особенностей опухоли, которые позволяют прогнозировать развитие и течение заболевания и оптимизировать индивидуальную противоопухолевую терапию.

Так как возникновение и развитие онкологического процесса напрямую связаны с на-

коплением мутаций в молекуле ДНК, методы молекулярной биологии широко используются в ведущих онкологических центрах мира. Большинство мутаций являются соматическими и играют важную роль в развитии *de novo* резистентности к противоопухолевым химиотерапевтическим средствам. Как следствие, многие исследования направлены на профилирование мутаций в образцах опухолей [1–4].

Принцип секвенирования нового поколения (NGS) основан на массовом параллельном секвенировании специальным образом подготовленных одонитевых библиотек фрагментированной ДНК исследуемых образцов. Технологии NGS являются эффективным методом поиска новых и редких соматических мутаций. Методы такого секвенирования могут быть использованы для поиска новых генетических изменений и связанных с ними потенциальных терапевтических мишеней для различных локализаций опухоли [5–8].

Секвенирование нового поколения позволяет обнаружить редкие генетические варианты и протестировать одновременно большое число генов на наличие в них клинически значимых мутаций в короткие сроки, в отличие от традиционных молекулярно-генетических методов [9]. Развитие персонализированного лечения онкологических заболеваний является одной из важных задач, для решения которой все чаще используют технологии высокопроизводительного секвенирования. Клиническая значимость новой технологии для выбора тактики лечения и назначения соответствующих таргетных препаратов была успешно продемонстрирована на примере использования NGS для молекулярно-генетического обследования больных раком поджелудочной железы [10] и немелкоклеточным раком легкого [11]. Примером внедрения молекулярной диагностики в персонализированную медицину в последние годы является идентификация соматических мутаций в генах *EGFR* и *BRAF*, позволяющая предсказывать клинический ответ на лечение и выживаемость и являющаяся основанием для выбора кандидатов для терапии гефитинибом и вемурафенибом, соответственно [12, 13].

Целью данного исследования являлось изучение соматических мутаций у пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого, проживающих на территории Беларуси, с использованием метода NGS.

Материалы и методы

В исследование включен 101 пациент с диагнозом НМРЛ (78 мужчин, 23 женщины), проходивший лечение в Минском городском

онкологическом диспансере с 2012 по 2018 гг. Гистологический тип опухоли был определен согласно гистологическим критериям ВОЗ (2015). Исследуемую группу составили пациенты с наиболее часто встречающимися гистологическими типами НМРЛ: 50 человек с ПКРЛ и 51 — с АК. Средний возраст пациентов составил $63,2 \pm 1,2$ года (от 39 до 88 лет). Сбор биологического материала проводился с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с анкетированием пациентов и решением этического комитета (№ 430, ред. 29.01.2018) на исследование образцов тканей и биологических жидкостей.

Образцы опухолевой ткани легкого были получены в ходе операции, погружены в стабилизирующую жидкость (RNAlater Stabilization Solution, «Thermo Scientific», Вильнюс) и заморожены. Выделение ДНК осуществляли путем гомогенизации образцов ткани в лизирующем STE-буфере с помощью лабораторного гомогенизатора Tissue Lyser II и последующей ферментативной обработкой протеиназой К. Далее проводили стандартную фенол-хлороформную экстракцию ДНК и очистку этанолом. Концентрацию двухцепочечной ДНК измеряли на флуориметре Quantus. Пробоподготовку образцов ДНК для анализа с использованием набора TruSeq Amplicon Cancer Panel проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя на приборе MiSeq (Illumina, США). Перечень анализируемых генов, входящих в набор TruSeq Amplicon Cancer Panel, представлен в табл. 1 [14].

Таблица 1

Перечень генов, входящих в панель TruSeq Amplicon — Cancer Panel

ABL1	CSF1R	FGFR3	JAK2	NOTCH1	RET
AKT1	CTNNB1	FLT3	JAK3	NPM1	SMAD4
ALK	EGFR	GNA11	KDR	NRAS	SMARCB1
APC	ERBB2	GNAQ	KIT	PDGFRA	SMO
ATM	ERBB4	GNAS	KRAS	PIK3CA	SRC
BRAF	FBXW7	HNF1A	MET	PTEN	STK11
CDH1	FGFR1	HRAS	MLH1	PTPN11	TP53
CDKN2A	FGFR2	IDH1	MPL	RB1	VHL

Обработка первичных данных и получение прочтений с дальнейшим их выравниванием на целевые участки референсного генома (hg19) проводились с использованием программного обеспечения секвенатора (MiSeq Reporter), последующая фильтрация, аннотирование, верификация и интерпретация вариантов (работа с vcf- и bam-файлами) — с помощью программных средств ANNOVAR, VariantStudio, Integrative Genomics Viewer (IGV). Для определения роли изучаемых соматических мутаций в развитии НМРЛ использовали электронную базу данных COSMIC v87 (от 13 ноября 2018) — каталог соматических мутаций, являющийся крупнейшим в мире и наиболее полным ресурсом для изучения влияния соматических мутаций на онкологические заболевания человека [15].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов прикладных программ GraphPad InStat (версия 3.05) и онлайн-программы SNPStats Каталонского института онкологии ICO [16]. Статистическую значимость различий между изучаемыми группами определяли с помощью теста χ^2 с поправкой Йетса.

Результаты и обсуждение

После проведения фильтрации путем исключения всех вариантов с низким качеством (глубина прочтения <50; частота альтернативного аллеля <15%; варианты, не прошедшие PASS-фильтр) в общей сложности получено 86 вариантов соматических мутаций по 101 образцу опухолей, в среднем 0,85 вариантов на опухоль (табл. 2). Из них 44 варианта приходятся на АК (1–44), 42 — на ПКРЛ (45–86).

Таблица 2

Перечень обнаруженных соматических мутаций у пациентов с АК и ПКРЛ

№ п/п	Шифр образца	Пол	Статус курения	Ген	Аминокислотная замена	Значение мутации
1	202т	м	курит	<i>TP53</i>	p.His179Arg	миссенс
2	205т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Ala161Thr	миссенс
3	206т	м	курит	<i>KRAS</i>	p.Gly12Cys	миссенс
4	206т	м	курит	<i>STK11</i>	p.Ser69Ter	стоп-кодон
5	211т	ж	не курит	<i>ATM</i>	p.Ala1954Val	миссенс
6	211т	ж	не курит	<i>EGFR</i>	p.Glu746_Ala750 del	делеция
7	215т	ж	не курит	<i>EGFR</i>	p.772_773insHT	инсерция
8	217т	м	курит	<i>KRAS</i>	p.Gly12Cys	миссенс
9	219т	ж	не курит	<i>EGFR</i>	p.Glu746_Ala750 del	делеция
10	228т	ж	не курит	<i>EGFR</i>	p.Leu747_Pro753 delinsSer	делеция
11	231т	м	курит	<i>NRAS</i>	p.Gln61Leu	миссенс
12	231т	м	курит	<i>CTNNB1</i>	p.Ser37Phe	миссенс
13	231т	м	курит	<i>BRAF</i>	p.Gly464Val	миссенс
14	233т	ж	не курит	<i>CTNNB1</i>	p.Thr41Ala	миссенс
15	233т	ж	не курит	<i>EGFR</i>	p.Glu746_Ala750 del	делеция
16	293т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Val274Leu	миссенс
17	297т	ж	не курит	<i>EGFR</i>	p.Leu858Arg	миссенс
18	299т	м	курит	<i>EGFR</i>	p.His773dup	инсерция
19	308т	ж	не курит	<i>EGFR</i>	p.Leu858Arg	миссенс

Продолжение табл. 2

№ п/п	Шифр образца	Пол	Статус курения	Ген	Аминокислотная замена	Значение мутации
20	311т	м	нет данных	<i>CTNNB1</i>	p.Asp32Tyr	миссенс
21	351т	м	курит	<i>KRAS</i>	p.Gly12Cys	миссенс
22	355т	м	не курит	<i>KRAS</i>	p.Gly12Cys	миссенс
23	355т	м	не курит	<i>TP53</i>	p.Gln192Ter	стоп-кодон
24	356т	м	не курит	<i>PIK3CA</i>	p.His1047Arg	миссенс
25	356т	м	не курит	<i>FGFR2</i>	p.Tyr376Cys	миссенс
26	363т	м	курит	<i>KRAS</i>	p.Gly12Asp	миссенс
27	364т	ж	не курит	<i>EGFR</i>	p.Asn771dup	инсерция
28	364т	ж	не курит	<i>EGFR</i>	p.Pro772Arg	миссенс
29	367т	м	не курит	<i>KRAS</i>	p.Gly12Ala	миссенс
30	367т	м	не курит	<i>STK11</i>	p.Glu199Ter	стоп-кодон
31	371т	ж	нет данных	<i>EGFR</i>	p.Glu746_Ala750del	делеция
32	371т	ж	нет данных	<i>TP53</i>	p.Asp281Asn	миссенс
33	497т	м	курит	<i>ERBB4</i>	p.Arg168Gln	миссенс
34	499т	ж	курит	<i>EGFR</i>	p.Glu746_Ala750del	делеция
35	507т	м	курит	<i>PDGFRA</i>	p.Val561Ala	миссенс
36	507т	м	курит	<i>KDR</i>	p.Ser968Cys	миссенс
37	507т	м	курит	<i>EGFR</i>	p.Leu718Gln	миссенс
38	507т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Asp281Asn	миссенс
39	520т	м	не курит	<i>EGFR</i>	p.Leu858Arg	миссенс
40	524т	ж	не курит	<i>SMAD4</i>	p.Ala202Val	миссенс
41	550т	м	курит	<i>KRAS</i>	p.Gly12Cys	миссенс
42	566т	м	курит	<i>KRAS</i>	p.Gly12Cys	миссенс
43	601т	м	нет данных	<i>ATM</i>	p.Ile2752Met	миссенс
44	601т	м	нет данных	<i>KRAS</i>	p.Gly12Val	миссенс
45	203т	ж	курит	<i>TP53</i>	p.Pro152_Pro153del	делеция
46	210т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Val157Phe	миссенс
47	220т	м	не курит	<i>TP53</i>	p.Asn210Lysfs Ter6	сдвиг ORF
48	222т	м	не курит	<i>FBXW7</i>	p.Arg505Gly	миссенс
49	225т	м	курит	<i>TP53</i>	p.His214Arg	миссенс
50	234т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Phe270Leufs Ter72	сдвиг ORF
51	235т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Arg156ProfsTer23	сдвиг ORF
52	288т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Gln136Ter	стоп-кодон
53	292т	м	нет данных	<i>FBXW7</i>	p.Arg465His	миссенс

Окончание табл. 2

№ п/п	Шифр образца	Пол	Статус курения	Ген	Аминокислотная замена	Значение мутации
54	306т	м	курит	<i>PIK3CA</i>	p.His1047Arg	миссенс
55	306т	м	курит	<i>KRAS</i>	p.Gly12Asp	миссенс
56	306т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Val157Phe	миссенс
57	315т	м	не курит	<i>PIK3CA</i>	p.Glu545Lys	миссенс
58	354т	м	курит	<i>KDR</i>	p.Asp276His	миссенс
59	354т	м	курит	<i>GNAQ</i>	p.Ala302Thr	миссенс
60	359т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Ser183Ter	стоп-кодон
61	361т	м	курит	<i>EGFR</i>	p.His805Arg	миссенс
62	362т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Pro278Ala	миссенс
63	368т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Gly334Val	миссенс
64	493т	м	курит	<i>TP53</i>	p.Gln100Ter	стоп-кодон
65	501т	м	курит	<i>NRAS</i>	p.Lys42Glu	миссенс
66	501т	м	курит	<i>PDGFRA</i>	p.Trp559Arg	миссенс
67	501т	м	курит	<i>KIT</i>	p.Ile841Thr	миссенс
68	501т	м	курит	<i>MET</i>	p.Lys1281Met	миссенс
69	501т	м	курит	<i>GNAQ</i>	p.His218Arg	миссенс
70	501т	м	курит	<i>FGFR2</i>	p.Met541Thr	миссенс
71	501т	м	курит	<i>ATM</i>	p.Phe2732Ser	миссенс
72	501т	м	курит	<i>ATM</i>	p.Ile3036Lys	миссенс
73	501т	м	курит	<i>RB1</i>	p.Ile573Thr	миссенс
74	501т	м	курит	<i>TP53</i>	p.His214Leu	миссенс
75	501т	м	курит	<i>ERBB2</i>	p.Glu757Val	миссенс
76	501т	м	курит	<i>SMAD4</i>	p.Val350Asp	миссенс
77	509т	м	курит	<i>PTEN</i>	p.Lys254Glu	миссенс
78	512т	м	курит	<i>FBXW7</i>	p.Val565Ile	миссенс
79	518т	м	курит	<i>APC</i>	p.Tyr1147His	миссенс
80	518т	м	курит	<i>APC</i>	p.Arg1331Ser	миссенс
81	522т	м	курит	<i>APC</i>	p.Phe1396Ile	миссенс
82	522т	м	курит	<i>EGFR</i>	p.Leu858Pro	миссенс
83	522т	м	курит	<i>ABL1</i>	p.His380Tyr	миссенс
84	523т	м	курит	<i>SMO</i>	p.Phe222Ser	миссенс
85	523т	м	курит	<i>RB1</i>	p.Glu554Asp	миссенс
86	551т	м	нет данных	<i>FBXW7</i>	p.Ala502Val	миссенс

Примечание. ORF — открытая рамка считывания; м — мужской пол; ж — женский пол

Наиболее часто встречались однонуклеотидные варианты, приводящие к миссенс-мутациям, образованию стоп-кодонов, делеции и инсерции, не приводящие к сдвигу рамки считывания, а также делеции и инсерции, вызывающие сдвиг рамки считывания и образование терминирующего кодона на некотором расстоянии от места изменения нуклеотидной последовательности.

Не все случаи делеций и инсерций в гене *EGFR* (4 из 9) были аннотированы с помощью программ ANNOVAR и VariantStudio, но были визуализированы с помощью программного средства для просмотра прочтений IGV. Кроме того, у одной пациентки с АК (364т) впервые выявлено сочетание инсерции p.771insN и миссенс-мутации p.P772R, которое не было описано ранее в базе данных COSMIC, и подтверждено методом секвенирования по Сэнгеру с предварительным клонированием фрагмента на вектор. У пациента с ПКРЛ (361т) в 20 экзоне гена *EGFR* выявлена мутация p.H805R (подтверждена секвенированием по Сэнгеру), описанная ранее по данным COSMIC только у одного пациента с раком почки.

Сравнительный анализ частоты распределения мутаций у пациентов в зависимости от гистологического типа показал, что у пациентов с АК преобладают мутации в генах, кодирующих компоненты RAS/RAF/MAPK-киназного сигнального пути, у пациентов с ПКРЛ — мутации в генах, кодирующих компоненты P53/Rb-сигнального пути и PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути. При АК соматические мутации чаще всего обнаруживались в генах *EGFR* (25,5%), *KRAS* (17,6%), *TP53* (9,8%), *ATM* (7,5%), *CTNNB1* (5,7%), *STK11* (5,7%); при ПКРЛ — в генах *TP53* (26,0%), *ATM* (14,0%), *FBXW7* (8,0%), *FGFR3* (6,0%), *JAK3* (6,0%), *RET* (6,0%), *APC* (4,0%), *EGFR* (4,0%), *PIK3CA* (4,0%).

Анализ ассоциации изучаемых соматических мутаций с развитием определенного гистологического типа показал, что мутации генов *EGFR* и *KRAS* ассоциированы с развитием АК (OR = 9,08; 95% CI 1,94–42,48 и OR = 10,50; 95% CI 1,28–86,37 соответственно). Наблюдается тенденция увеличения частоты встречаемости мутаций гена *TP53* у пациентов с ПКРЛ (табл. 3).

Таблица 3

Связь соматических мутаций генов *EGFR*, *KRAS* и *TP53* с гистологическим типом опухоли

Ген	АК, n (%)	ПКРЛ, n (%)	OR (95% CI)	p
<i>EGFR</i> (wt)	37 (72,5)	48 (96,0)	0,11 (0,02-0,52)	0,003
<i>EGFR</i> (mut)	14 (27,5)	2 (4,0)	9,08 (1,94-42,48)	
<i>KRAS</i> (wt)	42 (82,4)	49 (98,0)	0,10 (0,01-0,78)	0,02
<i>KRAS</i> (mut)	9 (17,6)	1 (2,0)	10,50 (1,28-86,37)	
<i>TP53</i> (wt)	46 (90,2)	37 (74,0)	0,31 (0,10-0,95)	0,06
<i>TP53</i> (mut)	5 (9,8)	13 (26,0)	3,23 (1,06-9,89)	

Примечание. wt — дикий вариант, mut — мутантный вариант

Проведенный анализ связи частоты встречаемости соматических мутаций с полом пациентов показал, что среди носителей мутаций в гене *EGFR* преобладают женщины: частота мутаций у женщин составила 56,5%, а среди мужчин только 3,8% (OR = 32,50; 95% CI 7,87–134,26) (табл. 4). Соматические мутации в гене *KRAS* выявлены у 10 пациентов, обнаружены

только у мужчин (12,8%) и не встречались у женщин. Наиболее распространенной в данной выборке пациентов является соматическая мутация с.34G>T (p.Gly12Cys), которая встречается у 7,7% пациентов мужского пола. Соматические мутации в гене *TP53* обнаружены преимущественно у мужчин (21,8%) и только у одной женщины (4,3%).

Таблица 4

Связь соматических мутаций генов *EGFR*, *KRAS* и *TP53* с полом пациентов с НМРЛ

Ген	Мужчины, n (%)	Женщины, n (%)	OR (95% CI)	p
<i>EGFR</i> (wt)	75 (96,2)	10 (43,5)	0,03 (0,01–0,13)	<0,0001
<i>EGFR</i> (mut)	3 (3,8)	13 (56,5)	32,50 (7,87–134,26)	
<i>KRAS</i> (wt)	68 (87,2)	23 (100)	0,14 (0,01–2,46)	0,15
<i>KRAS</i> (mut)	10 (12,8)	0 (0)	7,20 (0,41–127,85)	
<i>TP53</i> (wt)	61 (78,2)	22 (95,7)	0,16 (0,02–1,30)	0,10
<i>TP53</i> (mut)	17 (21,8)	1 (4,3)	6,13 (0,77–48,85)	

Примечание. wt — дикий вариант, mut — мутантный вариант

На сегодняшний момент нет точных сведений, объясняющих причину возникновения и механизм развития того или иного гистологического типа рака легкого. Можно предположить, что на эти процессы оказывает влияние большее или меньшее проникновение и накопление канцерогенов либо в эпителиальных клетках бронхов, из которых развивается преимущественно эпителиальный ПКРЛ, либо в бокаловидных клетках крупных бронхов, мутационная трансформация которых дает начало АК. Использование технологии секвенирования нового поколения позволило получить данные о молекулярно-генетических особенностях опухолей легкого, которые могут применяться в качестве дополнительного фактора определения гистологического типа опухоли в диагностически сложных клинических случаях, а также важны для анализа ассоциации с прогнозом течения заболевания, что будет проводиться на следующем этапе исследования.

Важным для мутационного анализа опухолей легкого является обнаружение точковых мутаций, а также делеций и инсерций. Известно, что выявление делеций и инсерций методом NGS является затруднительным [17, 18]. В нашем исследовании только две делеции из шести и две инсерции из трех были идентифицированы при аннотировании с использованием программ ANNOVAR и VariantStudio. Тем не менее данный тип мутаций визуализируется при просмотре прочтений с помощью программы IGV. При валидации результатов оказалось, что число нуклеотидов делеций/

инсерций соответствует данным, полученным методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

Как известно, в регуляции опухолевого патогенеза НМРЛ участвуют основные тирозинкиназные каскады: RAS/RAF/MAPK и PI3K/AKT/mTOR [19, 20]. Активация развития АК и ПКРЛ различается способом передачи митогенного сигнала внутрь клетки [21–23]. S. Dearden с соавторами на английской и азиатской популяции показали, что при развитии АК важную роль играет RAS/RAF/MAPK-сигнальный путь: мутации в генах *EGFR* и *KRAS* чаще встречаются у пациентов с АК (19,2% и 26,1%), чем у пациентов с ПКРЛ (3,3% и 6,4% соответственно). Кроме того, при развитии как АК, так и ПКРЛ принимает участие сигнальный путь P53/Rb: мутации в гене *TP53* у пациентов с АК встречаются с частотой 30,8%, при ПКРЛ — с частотой 54,9% [22]. Результаты проведенного исследования демонстрируют соответствие этим данным: при АК соматические мутации чаще всего обнаруживались в генах *EGFR* и *KRAS*. Кроме того, показано, что мутации гена *EGFR* встречаются преимущественно у женщин, а мутации гена *KRAS* выявлены только у пациентов мужского пола. Мутации гена *TP53* в исследуемой выборке характерны преимущественно для пациентов с ПКРЛ и мужчин, так как известно, что этот гистологический тип рака легкого чаще встречается у курящих мужчин, в то время как аденокарцинома — рак некурящих пациентов [24–27]. Наличие мутаций в ключевых генах сигнальных путей и различная

частота их встречаемости в зависимости от гистологического типа опухоли указывает на гетерогенность опухолей НМРЛ и различную активацию развития его основных гистологических типов. Полученные данные по встречаемости соматических мутаций гена *EGFR* можно использовать для оптимизации тактики лечения пациентов с аденокарциномой таргетными препаратами, зарегистрированными на территории Республики Беларусь.

Заключение

Таким образом, с использованием технологии секвенирования нового поколения получены данные о молекулярно-генетических особенностях опухолей легкого у пациентов Беларуси. Полученные результаты показывают возможность использования методов на основе анализа NGS-данных для идентификации мутаций в опухолях НМРЛ, что открывает новые перспективы для разработки персонализированных подходов к диагностике и терапии опухолей, позволяя учитывать особенности геномов опухолей при подборе противоопухолевых лекарственных препаратов.

Работа выполнена в рамках задания 6.5 С НТП Союзного государства «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства».

Список использованных источников

1. Genomic profiling toward precision medicine in non-small cell lung cancer: getting beyond *EGFR* / A.L. Richer [et al.] // Pharmacogenomics and Personalized Medicine. — 2015. — Vol. 8. — P. 63–79.
2. Analysis of next-generation genomic data in cancer: accomplishments and challenges / L. Ding [et al.] // Hum Mol Genet. — 2010. — Vol. 15. — P. 188–196.
3. Multi-institutional oncogenic driver mutation analysis in lung adenocarcinoma: the lung cancer mutation consortium experience / L.M. Sholl [et al.] // J Thorac Oncol. — 2015. — Vol. 10, № 5. — P. 768–777.
4. Comparison of clinical targeted next-generation sequence data from formalin-fixed and

fresh-frozen tissue specimens / D.H. Spencer [et al.] // J Mol Diagn. — 2013. — Vol. 15, № 5. — P. 623–633.

5. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma / G. Guo [et al.] // Nat Genet. — 2011. — Vol. 44, № 1. — P. 17–19.

6. Next-generation sequencing approach to non-small cell lung carcinoma yields more actionable alterations / M. Mehrad [et al.] // Arch Pathol Lab Med. — 2018. — Vol. 142, № 3. — P. 353–357.

7. The genomic complexity of primary human prostate cancer / M.F. Berger [et al.] // Nature. — 2011. — Vol. 470, № 7333. — P. 214–220.

8. Next-generation sequencing-based method shows increased mutation detection sensitivity in an Indian retinoblastoma cohort / J. Singh [et al.] // Mol Vis. — 2016. — Vol. 22. — P. 1036–1047.

9. Germline variation in cancer-susceptibility genes in a healthy, ancestrally diverse cohort: implications for individual genome sequencing [Электронный ресурс]. — D.L. Bodian [et al.] // PLoS One. — Режим доступа: <http://igc.by/wp-content/uploads/2016/08/Том-24.pdf>. — Дата доступа: 27.12.2018.

10. Mardis, E. R. Applying next-generation sequencing to pancreatic cancer treatment / E.R. Mardis // Nat Rev Gastroenterol Hepatol. — 2012. — Vol. 9, № 8. — P. 477–486.

11. Complex mutations & subpopulations of deletions at exon 19 of *EGFR* in NSCLC revealed by next generation sequencing: potential clinical implications [Электронный ресурс]. — A. Marchetti [et al.] // PLoS One. — Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3407088/pdf/pone.0042164.pdf>. — Дата доступа: 27.12.2018.

12. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma / T.S. Mok [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 361. — P. 947–957.

13. Improved survival with vemurafenib in melanoma with *BRAF* V600E mutation / P.B. Chapman [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2011. — Vol. 364, № 26. — P. 2507–2516.

14. Illumina [Электронный ресурс] / Clinical Research Products. — Режим доступа: <https://emea.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/truseq-amplicon-can>

cer-panel.html?langsel=/ru/. — Дата доступа: 31.01.2019.

15. COSMIC, the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer [Электронный ресурс] / COSMIC v87, released 13-NOV-18. — Режим доступа: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. — Дата доступа: 31.01.2019.

16. SNPStats: Your web tool for SNP analysis. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.snpsstats.net/start.htm?q=snpstats/start.htm>. — Дата доступа: 31.01.2019.

17. Next-generation sequencing-based multi-gene mutation profiling of solid tumors using fine needle aspiration samples: promises and challenges for routine clinical diagnostics / R. Kanagal-Shamanna [et al.] // *Modern Pathology*. — 2014. — Vol. 27. — P. 314–327.

18. Clinical next-generation sequencing in patients with non-small cell lung cancer / I.S. Hagemann [et al.] // *Cancer*. — 2015. — Vol. 15. — P. 631–639.

19. Synergistic inhibition of HCC and liver cancer stem cell proliferation by targeting RAS/RAF/MAPK and WNT/ β -catenin pathways / R. Galuppo [et al.] // *Anticancer Res*. — 2014. — Vol. 34, № 4. — P. 1709–1713

20. Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK / E Martinelli [et al.] // *Cancer Treat Rev*. — 2017. — Vol. 53. — P. 61–69.

21. *PIK3CA* mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies / M. Scheffler [et al.] // *Oncotarget*. — 2015. — Vol. 6, № 2. — P. 1315–1326.

22. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap) / S. Dearden [et al.] // *Ann Oncol*. — 2013. — Vol. 24, № 9. — P. 2371–2376.

23. Squamousness: Next-generation sequencing reveals shared molecular features across squamous tumor types / M. Schwaederle [et al.] // *Cell Cycle*. — 2015. — Vol. 14, № 14. — P. 2355–2361.

24. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. — 2011. — Vol. 144. — P. 646–674.

25. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (Белорусский канцер-регистр) / А.Е. Океанов [и др.]; под ред. О.Г. Суконко. — Минск: РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2017. — 286 с.

26. Имянитов, Е.Н. Молекулярная онкология: клинические аспекты / Е.Н. Имянитов, К.П. Хансон // СПб. — 2007. — 211 с.

27. Копнин, Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены / Б.П. Копнин // *Канцерогенез*. — 2000. — С. 75–92.

A.N. Shchayuk¹, A.P. Mikhaleuka¹, O.M. Malysheva¹, M.N. Shapetska², V.G. Lyabetsky³, V.I. Litokhin⁴,
A.V. Kilchevsky¹

DETECTION OF SOMATIC MUTATIONS IN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER BY NEXT-GENERATION SEQUENCING

¹Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University
Minsk, 220116, the Republic of Belarus

³City Clinical Anatomicopathological Bureau
Minsk, 220045, the Republic of Belarus

⁴Minsk City Clinical Oncologic Dispensary
Minsk, 220013, the Republic of Belarus

Using the technology of next-generation sequencing, an analysis of disorders in 48 genes was carried out in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) living in Belarus and the data on the molecular features of two main histological types of lung cancer were obtained — squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (AC). A comparative analysis of the mutation spectrum in the tumor of SCC and AC patients showed a significant difference in their molecular profile: in AC patients, mutations in the genes encoding the components of the RAS/RAF/MAPK kinase signaling pathway prevail, and mutations in the genes encoding components of P53/Rb and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways prevail in SCC patients.

Key words: non-small cell lung cancer, next-generation sequencing, squamous cell carcinoma of the lung, lung adenocarcinoma.

Дата поступления статьи: 1 февраля 2019 г.

О.М. Малышева¹, Е.П. Михаленко¹, В.Ф. Аджиева¹, А.П. Сухарева^{2,3}, М.В. Артюшевская³,
К.А. Гомолко², А.В. Кильчевский¹, Г.А. Шишко³

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ RS1124, RS4715 И RS2070687 ГЕНА *SFTPC* У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С СИНДРОМОМ ДЫХАТЕЛЬНЫХ РАССТРОЙСТВ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²УЗ «Клинический родильный дом Минской области»

Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Ф. Скорины, 16

³ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3

Исследована частота встречаемости полиморфных вариантов rs4715 (с.413C→A, р.Т138N), rs1124 (с.557 G→A, Ser186Asn) и rs2070687 (с.436-8 C→G) гена *SFTPC* у 125 недоношенных новорожденных в сроке гестации 28–34 недели с синдромом дыхательных расстройств (СДР) и у 146 здоровых доношенных новорожденных (группа сравнения). Обнаружено статистически значимое увеличение ($p = 0,044$) частоты встречаемости гетерозиготного генотипа C/A rs4715 в 4 экзоне в группе недоношенных новорожденных с тяжелым СДР по сравнению с группой СДР умеренной степени тяжести среди мальчиков. В группе девочек с тяжелым СДР достоверно чаще ($p = 0,009$) встречался гомозиготный вариант C/C rs4715 по сравнению с группой с умеренным СДР.

Ключевые слова: полиморфизм генов, синдром дыхательных расстройств, недоношенные новорожденные, сурфактантный белок С.

Введение

В структуре заболеваемости и смертности недоношенных новорожденных дыхательные расстройства занимают значительный удельный вес. Частота развития патологии органов дыхания у недоношенных младенцев составляет 5% и увеличивается с уменьшением гестационного возраста, достигая 40–60% у детей с экстремально низкой массой тела при рождении. Наиболее частой причиной нарушения дыхательной функции у новорожденных является синдром дыхательных расстройств (СДР) [1, 2, 3].

Синдром дыхательных расстройств характеризуется дыхательной недостаточностью, обусловленной незрелостью легких и недостатком сурфактанта, возникающим вследствие нарушения его синтеза и экскреции и/или врожденного дефекта его структуры [4]. Сурфактант представляет собой липопротеиновый комплекс, покрывающий поверхность альвеолярного эпителия. Липидная фракция составляет чуть более 90 % общей массы сурфактанта, белковая часть (10%) представлена

преимущественно 4 протеинами — SP-A, SP-B, SP-C и SP-D. Сурфактант синтезируется и секретируется альвеолоцитами II типа и обнаруживается в легких с 24 недели гестации, однако его активная продукция начинается с 28-й недели [4]. Перинатальными факторами риска развития СДР у недоношенного новорожденного являются: мужской пол, принадлежность к европеоидной расе, кесарево сечение при отсутствии родовой деятельности, сахарный или гестационный диабет у матери, многоплодная беременность, второй из двойни [5].

СДР является многофакторной и полигенной патологией, развитие которой обусловлено сложным взаимодействием как генетических, так и внешнесредовых факторов. Изучение таких факторов даст возможность разработать методы профилактики и прогнозирования постнатального развития заболевания и лечения детей с СДР. Учитывая, что в патогенезе синдрома дыхательных расстройств ключевым моментом является недостаточность сурфактантной системы легких, во многих научных центрах проводятся

исследования роли полиморфных вариантов генов белков сурфактанта в формировании наследственной предрасположенности к дыхательным расстройствам у новорожденных [6]. Наибольший интерес представляют молекулярные нарушения в генах *SFTPB* и *SFTPC*, кодирующих гидрофобные белки SP-B и SP-C, которые играют непосредственную роль в сборке сурфактантного комплекса. В гене *SFTPC* выявляется широкий спектр нарушений от патогенных мутаций до нейтральных полиморфных вариантов, при этом фенотипическое проявление этих изменений во многом определяется этнической принадлежностью исследуемых групп [3, 6].

Цель данного исследования — изучение связи полиморфных вариантов rs1124, rs4715 и rs2070687 гена *SFTPC* с течением синдрома дыхательных расстройств у недоношенных новорожденных, а также их распределение в изучаемой группе и в группе сравнения (здоровые доношенные новорожденные).

Материалы и методы

В работе проанализированы образцы ДНК 271 ребенка, родившегося в УЗ «Клинический родильный дом Минской области» в 2016–2018 гг. Основную группу исследования составили 125 недоношенных новорожденных.

Критерии включения пациентов в исследование:

- гестационный возраст от 28 до 34 недель;
- синдром дыхательных расстройств различной степени тяжести;
- наличие письменного информированного согласия законного представителя.

Критерии исключения пациентов из исследования:

- многоплодная беременность;
- наследственные и врожденные заболевания;
- ВИЧ-инфекция у матери;
- инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода.

Группа сравнения включала 146 здоровых доношенных новорожденных, гестационный возраст которых был в пределах 37–40 недель.

Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с международными нормами [7]. Проведение исследования разрешено Комитетом по этике БелМАПО.

Материалом для исследования полиморфизмов гена *SFTPC* послужила геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов пуповинной и периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К [8].

Для выявления полиморфизма rs4715 (с.413 C→A, р.Т138N) гена *SFTPC* использовали метод ПЦР с последующим анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Амплификация фрагмента 4 экзона длиной 189 п. о. проведена с использованием пары олигонуклеотидных праймеров: прямой — 5' - GCC ACT TCA TCC ACA TCC - 3' и обратный — 5' - AAT AGG AGA GGG GCA GTC AG - 3' [9]. Условия ПЦР подобраны экспериментально: 5 мин денатурации при температуре 94 °C, далее 35 циклов при 94 °C 30 с, 59 °C 30 с, 72 °C 60 с, завершающий шаг — 72 °C в течение 5 мин. Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазой BfaI при 37 °C в течение ночи. Электрофоретическое разделение продуктов рестрикции проводили в 2,2-процентном агарозном геле. Аллелю А соответствовал фрагмент длиной 189 п. о., а аллелю С — два фрагмента длиной 97 и 92 п. о.

Изучение полиморфизмов rs1124 (с.557 G→A, Ser186Asn) и rs2070687 (с.436-8 C→G) проводили методом прямого секвенирования по Сенгеру. Для амплификации фрагмента 4 интрона и 5 экзона гена *SFTPC* была использована следующая пара олигонуклеотидных праймеров: прямой — 5' - TAC CTG GTG GCT TCT GAC T - 3' и обратный — 5' - CTG TGA AGC AAA GGA ATG TT - 3' [9]. Условия ПЦР подобраны экспериментально: 1 мин денатурации при температуре 94 °C, далее 35 циклов при 94 °C 10 с, 60 °C 30 с, 72 °C 15 с, завершающий шаг — 72 °C в течение 2 мин. Определение нуклеотидной последовательности проводилось методом прямого секвенирования на автоматическом анализаторе Applied Biosystems 3500 DNA Analyzer. Полученные последовательности ДНК анализировались в программе SequenceScanner v1.0.

Статистическую обработку данных проводили с использованием прикладной программы GraphPad InStat Version 3.05 и веб-инструмента SNPStats [10]. Тест на соответствие контрольной выборки равновесию Харди-Вайнбер-

га проводили с использованием метода χ^2 ($\alpha = 0,05$; $df = 1$). При сравнении частот встречаемости полиморфных вариантов в группах недоношенных новорожденных и контроля использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона; при условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса и точный тест Фишера. Связь между генотипами, гаплотипами и течением заболевания оценивали по отношению шансов (OR (95% CI)) с использованием кодоминантной модели SNPStats. OR указан с 95-процентным доверительным интервалом (confidence interval — CI) [11].

Результаты и обсуждение

Основная группа (недоношенные новорожденные) была разделена на 2 подгруппы. В подгруппу младенцев с тяжелым СДР включались дети, нуждающиеся в респираторной поддержке более суток, проведении сурфактантной терапии и оксигенотерапии после перевода на спонтанное дыхание (подгруппа 1). Структуру новорожденных подгруппы 1 составили 46 (53,5%) мальчиков и 40 (46,5%) девочек. Во вторую подгруппу входили недоношенные новорожденные, у которых диагностирован СДР умеренной степени тяжести (подгруппа 2). Структуру новорожденных подгруппы 2 составили 18 (46,2%) мальчиков и 21 (53,8%) девочка.

Оказание медицинской помощи новорожденным проводилось в полном соответствии с существующей в Республике Беларусь на данный момент нормативной документацией, в частности «Клиническими протоколами диагностики, реанимации и интенсивной терапии в неонатологии», утвержденными приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 81 от 28.01.2011 г.

Группу сравнения составили доношенные новорожденные. Состояние всех детей данной группы при рождении и в последующие дни вплоть до выписки из родильного дома оценивалось как удовлетворительное. Лабораторные данные общего анализа крови у детей в первые сутки жизни были в пределах возрастной нормы. Младенцы находились на совместном пребывании с матерями в режиме свободного грудного вскармливания и были выписаны домой на 4–5 сутки жизни.

Результаты генотипирования. Распределение частот генотипов по всем изученным полиморфизмам гена *SFTPC* в группе сравнения и группе пациентов с СДР соответствовало теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди – Вайнберга (для rs4715 $p = 0,7$ и $p = 0,83$ соответственно, для rs1124 $p = 0,6$ и $p = 0,7$ соответственно, для rs2070687 $p = 0,6$ и $p = 0,78$).

Анализ распределения частоты встречаемости полиморфных вариантов изучаемых полиморфизмов гена *SFTPC* не выявил существенных различий между группой недоношенных новорожденных и группой сравнения (табл. 1). При сравнении этих групп с учетом пола ребенка также не обнаружено достоверной разницы (табл. 1). В нашем исследовании показано, что частоты встречаемости полиморфных вариантов исследуемых полиморфизмов не различались в группах доношенных и недоношенных новорожденных.

На следующем этапе проанализирована связь полиморфных вариантов rs4715, rs1124 и rs2070687 с тяжестью синдрома дыхательных расстройств у недоношенных новорожденных. Результаты этого анализа представлены в табл. 2. Анализ распределения частот генотипов полиморфных локусов гена *SFTPC* не выявил статистически значимых различий между подгруппами недоношенных новорожденных. Однако, при учете двух признаков — степени тяжести СДР и пола, показано, что частота встречаемости гетерозиготного генотипа C/A rs4715 в 4 экзоне гена *SFTPC* у мальчиков с тяжелой формой СДР в 2,8 раза больше, чем у мальчиков с СДР умеренной степени тяжести (47,8% и 16,7% соответственно). При сравнении групп девочек с различной степенью тяжести синдрома дыхательных расстройств выявлено противоположное влияние полиморфизма rs4715: гетерозиготный генотип C/A в группе девочек с тяжелым СДР встречался в 2,4 раза реже, чем среди девочек с умеренным СДР (27,5% и 66,7% соответственно). В группе девочек с тяжелым СДР выявлено 67,5% носителей гомозиготного варианта C/C, что достоверно больше, чем среди девочек с умеренным СДР — 28,6% (рис. 1). Минорный аллель А достоверно чаще встречается у девочек с умеренным СДР ($\chi^2 = 4,46$; $p = 0,03$).

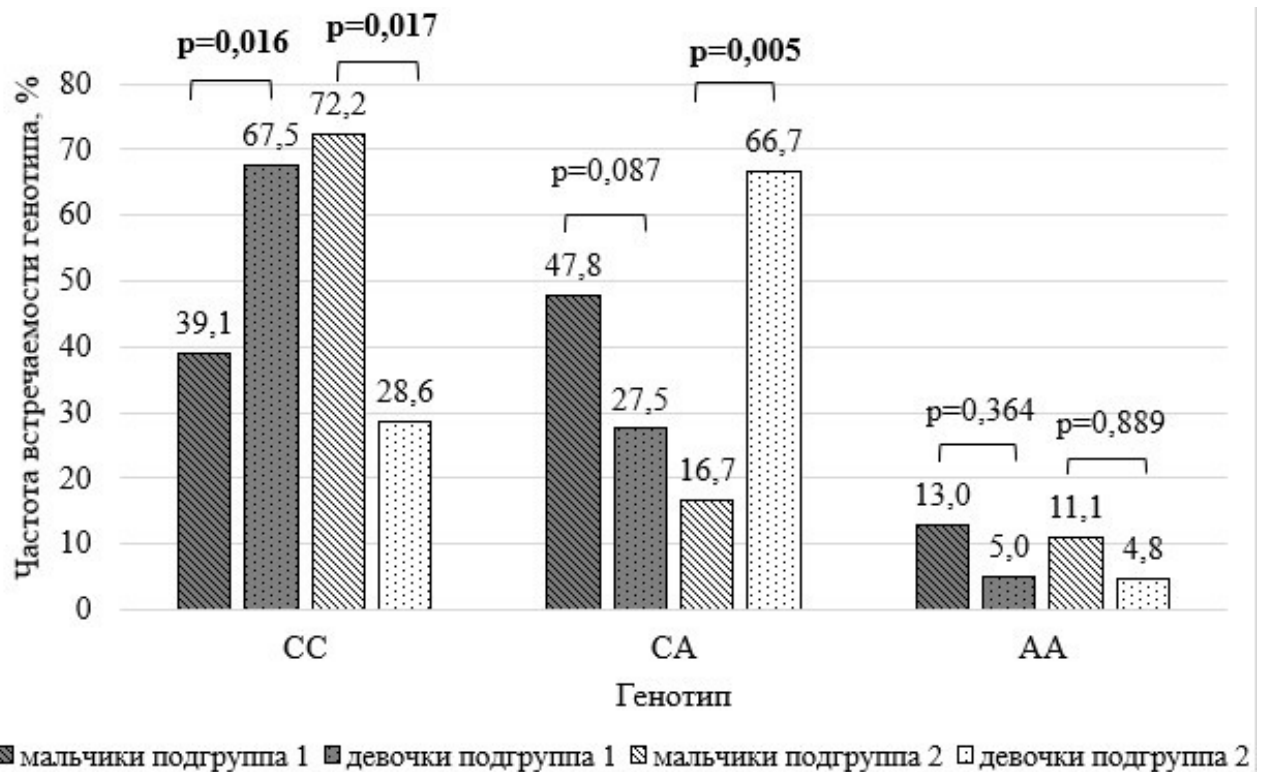


Рис. 1. Распределение частоты встречаемости генотипов rs4715 в исследуемых подгруппах с учетом пола

Можно предположить, что в исследуемой выборке гетерозиготный генотип C/A rs4715 *SFTPC* является рисковым в формировании тяжелого течения СДР у недоношенных мальчиков (OR = 5,30; 95% CI: 1,30–21,51; $p = 0,044$) и защитным у недоношенных девочек (OR = 0,17; 95% CI: 0,05–0,57; $p = 0,007$). У недоношенных девочек рисковым фактором развития тяжелого СДР является генотип C/C (OR = 5,19; 95% CI: 1,63–16,48; $p = 0,009$). Подтверждением этого предположения может служить выявленное различие по частоте встречаемости полиморфных вариантов rs4715 среди мальчиков и девочек как в группе с умеренным СДР, так и в группе с тяжелым СДР (рис. 1). В группе с умеренным СДР 72,2% носителей гомозиготного генотипа C/C были мальчики и 28,6% — девочки, в то время как среди носителей гетерозиготного варианта C/A 66,7% — девочки и только 16,7% — мальчики (χ^2 с поправкой Йетса = 5,74; $p = 0,01$ — для генотипа C/C и χ^2 с поправкой Йетса = 7,92; $p = 0,0049$ — для генотипа C/A). В группе с тяжелым СДР выявлена противоположная картина: среди носителей генотипа C/C чаще встречались девочки (67%), чем мальчики (39,1%), а 47,8% носителей гетерозиготного

генотипа C/A были мальчики и 27,5% девочки (χ^2 с поправкой Йетса = 5,81; $p = 0,015$ — для генотипа C/C и χ^2 с поправкой Йетса = 2,92; $p = 0,09$ — для генотипа C/A).

Обеспечение механики дыхания легких является важнейшей функцией легочного сурфактанта. Значительную роль в этом играют гидрофобные белки сурфактанта, к которым относится SP-C. Сурфактантный протеин C (SP-C) — небольшой гидрофобный белок, необходимый для снижения поверхностного натяжения путем усиления адсорбции и распространения фосфолипидов в поверхностный монослой легочной ткани [12].

Ген *SFTPC* локализован на коротком плече 8 хромосомы в положении 8p23.1, охватывает 3,5 тыс. п. о. и состоит из 6 экзонов, только первые пять из которых являются кодирующими. Нуклеотидная последовательность, соответствующая зрелому пептиду, ограничена 2 экзоном. Экспрессия гена *SFTPC* начинается с 24 недели беременности. Предшественник белка SP-C (proSP-C), имеющий молекулярную массу 22 кДа и состоящий из 191 или 197 аминокислотных остатков, подвергается поэтапному протеолизу с образованием зрелого пептида молекулярной массы 3,5 кДа [13].

Таблица 1
Распределение частот полиморфных вариантов rs4715, rs1124 и rs2070687 гена *SFTPC* у недоношенных новорожденных с СДР и в группе сравнения с учетом и без учета пола

Генотип	Мальчики				Девочки			
	Группа сравнения	Основная группа	OR (95% CI)	p*	Группа сравнения	Основная группа	OR (95% CI)	p*
rs4715	C/C (46,6%)	64 (51,2%)	1,00	0,73	28 (47,5%)	33 (54,1%)	1,00	0,74
	C/A (44,5%)	50 (40,0%)	0,82 (0,49–1,35)		27 (45,8%)	25 (41,0%)	0,79 (0,37–1,65)	
	A/A (8,9%)	11 (8,8%)	0,9 (0,38–2,15)		4 (6,8%)	3 (4,9%)	0,64 (0,13–3,09)	
C	201 (68,8%)	178 (71,2%)	0,89 (0,62–1,29)	0,55	83 (70,3%)	91 (74,6%)	0,81 (0,46–1,43)	0,46
A	91 (31,2%)	72 (28,8%)	1,12 (0,77–1,62)		35 (29,7%)	31 (25,4%)	1,24 (0,70–2,18)	
rs1124	G/G (41,1%)	53 (42,4%)	1,00	0,97	28 (47,5%)	27 (44,3%)	1,00	0,83
	A/G (44,5%)	55 (44,0%)	0,96 (0,57–1,60)		25 (42,4%)	29 (47,5%)	1,20 (0,57–2,55)	
	A/A (14,4%)	17 (13,6%)	0,92 (0,44–1,92)		6 (10,2%)	5 (8,2%)	0,86 (0,24–3,17)	
G	185 (63,4%)	161 (64,4%)	0,96 (0,67–1,36)	0,8	81 (68,6%)	83 (68,0%)	1,03 (0,60–1,77)	0,92
A	107 (36,6%)	89 (35,6%)	1,05 (0,74–1,49)		37 (31,4%)	39 (32,0%)	0,97 (0,56–1,68)	
C/C (65,1%)	95 (65,1%)	79 (63,2%)	1,00	0,63	38 (64,4%)	42 (68,8%)	1,00	0,12
C/G (30,1%)	44 (30,1%)	42 (33,6%)	1,15 (0,68–1,93)		17 (28,8%)	19 (31,1%)	1,01 (0,46–2,22)	
G/G (4,8%)	7 (4,8%)	4 (3,2%)	0,69 (0,19–2,43)		4 (6,8%)	0 (0%)	0,00 (0,00–NA)	
C	234 (80,1%)	200 (80,0%)	1,01 (0,66–1,54)	0,97	93 (78,8%)	103 (84,4%)	0,69 (0,35–1,33)	0,26
G	58 (19,9%)	50 (20,0%)	0,99 (0,65–1,51)		25 (21,2%)	19 (15,6%)	1,46 (0,75–2,82)	

Примечание. * — значение p с поправкой Йетса при размере групп менее 5 случаев

Таблица 2
Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфизмов *SFTPC* у недоношенных новорожденных с СДР разной степени тяжести с учетом и без учета пола

Генотип	Мальчики				Девочки			
	Подгруппа 1	Подгруппа 2	OR (95% CI)	p*	Подгруппа 1	Подгруппа 2	OR (95% CI)	p*
rs4715	C/C (52,3%)	19 (48,7%)	1,00	0,72	18 (39,1%)	13 (72,2%)	1,00	0,044
	C/A (38,4%)	17 (43,6%)	0,82 (0,37–1,81)		22 (47,8%)	3 (16,7%)	5,30 (1,30–21,51)	
	A/A (9,3%)	3 (7,7%)	1,13 (0,27–4,71)		6 (13,0%)	2 (11,1%)	2,17 (0,38–12,50)	
	C (71,5%)	55 (70,5%)	0,95 (0,53–1,72)	0,87	58 (63,0%)	29 (80,6%)	2,43 (0,96–6,14)	0,089
	A (28,5%)	23 (29,5%)	1,05 (0,58–1,89)		34 (37,0%)	7 (19,4%)	0,41 (0,16–1,04)	
rs1124	G/G (45,4%)	14 (35,9%)	1,00	0,53	18 (39,1%)	8 (44,4%)	1,00	0,86
	A/G (40,7%)	20 (51,3%)	0,63 (0,28–1,43)		19 (41,3%)	7 (38,9%)	1,21 (0,36–4,01)	
	A/A (13,9%)	5 (12,8%)	0,86 (0,26–2,89)		9 (19,6%)	3 (16,7%)	1,33 (0,28–6,28)	
	G (65,7%)	48 (61,5%)	0,84 (0,48–1,45)	0,52	55 (59,8%)	23 (63,9%)	1,19 (0,54–2,64)	0,67
	A (34,3%)	30 (38,5%)	1,20 (0,69–2,08)		37 (40,2%)	13 (36,1%)	0,84 (0,38–1,87)	
rs2070687	C/C (59,3%)	28 (71,8%)	1,00	0,14	24 (52,2%)	13 (72,2%)	1,00	0,085
	C/G (38,4%)	9 (23,1%)	2,01 (0,84–4,80)		20 (43,5%)	3 (16,7%)	3,61 (0,90–14,48)	
	G/G (2,3%)	2 (5,1%)	0,55 (0,07–4,11)		2 (4,3%)	2 (11,1%)	0,54 (0,07–4,31)	
	C (78,5%)	65 (83,3%)	1,37 (0,68–2,75)	0,38	68 (73,9%)	29 (80,6%)	1,46 (0,57–3,77)	0,43
	G (21,5%)	13 (16,7%)	0,73 (0,36–1,47)		24 (26,1%)	7 (19,4%)	0,68 (0,27–1,76)	

Примечание. * — значение p с поправкой Йетса при размере групп менее 5 случаев

Большая часть известных, в том числе патогенных, полиморфных вариантов расположена в С-концевом BRICHOS-доме (4–5 экзон гена *SFTPC*) предшественника зрелого белка, обеспечивающим правильный фолдинг и транспортировку белка по секреторным путям. Предполагается, что все найденные патогенные мутации этого региона приводят к аномальной (неправильно свернутой) форме proSP-C и быстро разрушаются, вызывая тем самым недостаток SP-C, или к формированию внутриклеточных агрегатов, которые токсичны для клетки [14]. Считается, что более половины однонуклеотидных замен в области 4–5 экзона возникает спонтанно и приводят не к отсутствию протеина SP-C, а к формированию дефектного белка либо к уменьшению его количества [15].

В данном исследовании были изучены миссенс-замены: полиморфизм rs4715 в 4 экзоне, который приводит к замене аминокислоты треонин на аспарагин (с.413C→A, p.T138N) и полиморфизм rs1124 в 5 экзоне, приводящий к замене аминокислоты серин на аспарагин (с.557G→A, p.S186N). Механизм, с помощью которого эти полиморфные варианты могут влиять на риск развития различных заболеваний легкого, до сих пор не ясен. Однако они расположены в соответствующей С-концевой части молекулы proSP-C, которая имеет решающее значение в процессинге proSP-C до зрелого сурфактантного белка С [12]. Кроме того, мы изучали полиморфизм rs2070687 (436-8 C→G), расположенный в 4 интроне в районе альтернативного сайта сплайсинга. Присутствие альтернативного сайта сплайсинга в начале 5 экзона влечет за собой образование двух разных видов мРНК, отличающихся вставкой или делецией 18 нуклеотидов [13].

Можно предположить, что полиморфизмы *SFTPC*, влияющие на уровень и активность сурфактанта, могут оказывать модифицирующую роль в формировании и течении дыхательных расстройств у недоношенных новорожденных. Литературные данные о влиянии полиморфизмов гена *SFTPC* на развитие и течения синдрома дыхательных расстройств малочисленны и противоречивы. При исследовании недоношенных новорожденных иранской популяции гестационного возраста до 34 недель было обнаружено, что

генотип А/А полиморфизма rs1124 является предрасполагающим фактором развития РДС у недоношенных девочек, частота встречаемости данного генотипа у новорожденных с умеренным РДС больше, чем у младенцев с тяжелой формой заболевания независимо от пола [12]. Помимо этого, изучение выборки новорожденных из Финляндии показало, что полиморфный вариант 138Asn (rs4715) и 186Asn (rs1124), а также гаплотип 138Asn-186Asn, достоверно более часто встречались в группе недоношенных девочек. В то же время данные закономерности не были выявлены в американской популяции [16]. Разные результаты в исследованиях могут быть связаны с различиями в этнической принадлежности новорожденных и критериях подбора анализируемых выборок.

В нашем исследовании не выявлено значимых различий по полу и частоте встречаемости полиморфных вариантов гена *SFTPC* в исследуемых группах. Однако показана связь с течением СДР полиморфных вариантов rs4715 с учетом пола недоношенных новорожденных, что согласуется с данными литературы по влиянию гендерных различий на выработку сурфактанта. По литературным данным известно, что легкие мальчиков примерно на 1 неделю более незрелые, чем легкие девочек, за счет действия фетальных андрогенов на фибробласты легких и ингибирования синтеза фосфатидилглицерола, входящего в состав сурфактанта [3]. Поэтому мальчики имеют большую вероятность появления СДР, чем девочки одного и того же гестационного возраста (в 1,7 раза чаще). Также было показано, что половые гормоны оказывают влияние на развитие легких плода. При этом молекулярный механизм влияния андрогенов и эстрогенов на развитие легких и синтез сурфактанта различен. Андрогены ингибируют активность и синтез сурфактанта путем изменения активности транскрипционных факторов (эпидермального фактора роста и трансформирующего фактора роста $\beta 1$). Влияние эстрогеновых рецепторов на уровень сурфактанта осуществляется посредством активации сигнальных путей фактора роста тромбоцитов, что приводит к дефектам альвеолярной структуры и снижению продукции сурфактанта [17].

Заключение

Таким образом, выявлены достоверные различия частоты встречаемости полиморфных вариантов rs4715 в 4 экзоне гена *SFTPC* между группами недоношенных новорожденных с умеренным и тяжелым СДР с учетом пола новорожденного. У недоношенных мальчиков с тяжелым СДР достоверно чаще встречались носители гетерозиготного генотипа С/А (OR = 5,30; 95% CI: 1,30–21,51; p = 0,044), а у недоношенных девочек с тяжелым СДР достоверно чаще — носители генотипа С/С (OR = 5,19; 95% CI: 1,63–16,48; p = 0,009).

Для подтверждения выявленных ассоциаций необходимы дальнейшие исследования на большей выборке новорожденных.

Научные исследования выполнялись в лаборатории экологической генетики и биотехнологии Института генетики и цитологии НАН Беларуси в рамках государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» на 2016–2018 гг., по заданию 17 «Разработать и внедрить метод прогнозирования исходов дыхательных расстройств у новорожденных на основании молекулярно-генетических исследований генов, ассоциированных с данной патологией».

Список использованных источников

1. Avery's neonatology: pathophysiology and management of the newborn / ed.: M.G. MacDonald, M.M.K. Seshia, M.D. Mullett. — 6th ed. — Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2005. — 1748 p.
2. Овсянников, Д.Ю. Врожденный дефицит белков сурфактанта [Электронный ресурс] / Д.Ю. Овсянников, М.А. Беяшова, А.А. Крушельцкий — Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/vrozhdennyi-defitsit-belkov-surfaktanta>. — Дата доступа: 20.01.2019.
3. Kendig and Chernick's disorders of the respiratory tract in children / ed.: R. W. Wilmott [et al.]. — 8th ed. — Philadelphia: Elsevier, 2012. — 1141 p.
4. Кириллова, Е.Н. Морфологические аспекты пренатальной профилактики респираторного дистресс-синдрома и сурфактантной терапии у новорожденных / Е.Н. Кириллова, И.В. Сахаров, В.А. Романенко // Медицинский журнал. — 2014. — № 2. — С. 60–65.
5. Шабалов, Н.П. Неонатология: Учебн. пособие: В 2 т. / Н.П. Шабалов — М.: МЕДпресс-информ, 2004. — Т. 1. — 608 с.
6. Данилко, К.В. Роль генов белков сурфактанта, цитокиновой сети и ренин-ангиотензивной системы в формировании дыхательных расстройств у новорожденных: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.15 / К.В. Данилко; Рос. акад. наук, Ин-т биохимии и генетики. — Уфа, — 2007. — 24 с.
7. World medical association declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects / World Medical Association // JAMA. — 2013. — Vol. 310, № 20. — P. 2191–2194.
8. Sambrook, J. Isolation of highmolecular-weight DNA from mammalian cells / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis // Molecular Cloning: a laboratory manual. — 2nd ed. — Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press. — 1989. — P. 9.14–9.23.
9. Two novel mutations in surfactant protein-C, lung function and obstructive lung disease / M. Bækvad-Hansen [et al.] Respiratory Medicine. — 2010. Vol. 104, № 3. — P. 418–425.
10. SNPStats: your web tool for SNP analysis [Electronic resource]. — Mode of access: <https://www.snpsstats.net/start.htm?>. — Date of access: 08.01.2019.
11. Гланц, С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. / С. Гланц. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
12. Association of SP-C gene codon 186 polymorphism (rs1124) and risk of RDS / N. Fatahi [et al.] // The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. — 2016. — V. 30, № — 21. — P. 2585–2589.
13. Clinical biological and genetic heterogeneity of the inborn errors of pulmonary surfactant metabolism / M. Tredano [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. — 2001. — V. 39, № 2. — P. 90–108.
14. Noguee, L.M. Genetics and physiology of surfactant protein deficiencies / L.M. Noguee // Fetal and Neonatal Physiology. — 2017. — P. 843–854.
15. Jo, H.S. Genetic risk factors associated with respiratory distress syndrome / H.S. Jo // Korean J. Pediatr. — 2014. — V. 57, № 4. — P. 157–163.
16. Lahti, M. Surfactant protein C gene varia-

- tion in the Finnish population — association with perinatal respiratory disease / M. Lahti, R. Marttila, M. Hallman // Eur. J. Hum. Genet. — 2004. — Vol. 12, № 3. — P. 12–20.
17. Gender differences in respiratory morbidity and mortality of preterm neonates / C.D. Townsel [et al.] // Frontiers in Pediatrics. — 2017. — Vol. 5. — P. 1–6.

V.M. Malyshava¹, A.P. Mikhaleuka¹, V.F. Ajyieva¹, A.P. Sukharava^{2,3}, M.V. Artsiusheuskaya³,
K.A. Gamolka², A.V. Kilchevsky¹, G.A. Shyshko³

POLYMORPHIC VARIANTS RS1124, RS4715, RS2070687 OF THE *SFTPC* GENE IN PRETERM NEWBORNS WITH RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

¹Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

²Clinical Maternity Hospital of Minsk Region
Minsk, 220114, the Republic of Belarus

³State Educational Establishment “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”
Minsk, 220013, the Republic of Belarus

The frequency of occurrence of polymorphic variants rs4715 (c.413C→A, p.T138N), rs1124 (c.557 G→A, Ser186Asn) and rs2070687 (c.436-8 C→G) of the *SFTPC* gene was investigated in 125 preterm newborns of 28–34 weeks of gestational age with respiratory distress syndrome and in 146 healthy full-term newborns (control group). A statistically significant increase ($p = 0.044$) in the frequency of occurrence of the heterozygous genotype C/A rs4715 in exon 4 in the group of preterm newborns with severe RDS was found when compared to the group of moderately severe RDS among boys. The homozygous C/C variant was significantly more frequent ($p = 0.009$) in the group of girls with severe RDS versus the group of girls with moderate RDS.

Key words: gene polymorphism, respiratory distress syndrome, preterm newborns, surfactant protein-C.

Дата поступления статьи: 5 февраля 2019 г.

Е.Г. Требка¹, А.В. Богачева², Н.Б. Гусина¹

ХРОМОСОМНЫЕ ТРАНСЛОКАЦИИ КАК ПРИЧИНА ОЛИГОЗООСПЕРМИИ ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ И НЕОБСТРУКТИВНОЙ АЗООСПЕРМИИ У МУЖЧИН

¹РНПЦ «Мать и дитя»

Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66
e-mail: Ekaterina.trebka@gmail.com

²Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220045, г. Минск, ул. Курчатова, 10

В статье представлены результаты исследования частоты разных типов хромосомных транслокаций в группах пациентов с олигозооспермией тяжелой степени и пациентов с необструктивной азооспермией. Обсуждается влияние носительства транслокаций на степень повреждения сперматогенеза у мужчин. Полученные данные указывают на негативное влияние на сперматогенез транслокаций с вовлечением половых хромосом, реципрокных транслокаций с вовлечением крупных хромосом, сочетания транслокации с трисомией половых хромосом в составе одного кариотипа.

Ключевые слова: олигозооспермия, необструктивная азооспермия, кариотип, транслокация.

Введение

Бесплодие, согласно определению ВОЗ, — это отсутствие беременности при регулярной половой жизни без предохранения в течение по крайней мере года. Частота бесплодного брака, по данным ВОЗ, составляет 10–15% от общего числа супружеских пар и не имеет тенденции к снижению. При этом нарушение репродуктивной функции у мужчин обуславливает до 40–50% всех случаев бесплодия супружеских пар [1–3]. Клинические проявления нарушений репродуктивной функции у мужчин могут выражаться различной степенью гипосперматогенеза от олигозооспермии до азооспермии и синдрома «только клетки Сертоли». Предполагается, что 30–50% тяжелых форм мужского бесплодия могут быть вызваны генетическими причинами, и наиболее распространенными из них являются хромосомные аномалии.

Согласно результатам исследований разных популяций к наиболее распространенным хромосомным аномалиям у мужчин с бесплодием относят количественные и структурные аномалии половых хромосом, которые вызывают снижение числа сперматозоидов вплоть до полного блока сперматогенеза [3–9]. Большинство исследователей также отмечают повышенную частоту структурных аномалий

аутосом, однако носительство транслокаций обычно не рассматривается в контексте выраженного негативного влияния на процесс сперматогенеза. Транслокации относятся к сбалансированному типу хромосомных перестроек, при котором происходит обмен участками между хромосомами (реципрокные транслокации, РцТ) или центрические слияния акроцентрических хромосом (робертсоновские транслокации, РбТ).

Носительство сбалансированной транслокации, как правило, не сопровождается нарушениями фенотипа. Однако у носителей существует повышенный риск дисбалансного кариотипа у плода при наступлении беременности, что может сопровождаться спонтанным прерыванием беременности или развитием хромосомной болезни у будущего ребенка. Помимо транслокаций между аутосомами встречаются крайне редкие транслокации с вовлечением половых хромосом. Подобные типы транслокаций у мужчин приводят к остановке мейотического деления и азооспермии. Исключение составляют транслокации с вовлечением спутничных районов акроцентрических хромосом и гетерохроматина Y-хромосомы.

Анализ литературы показал, что транслокации являются одной из самых распростра-

ненных структурных aberrаций хромосом не только в общей популяции, но и у мужчин с бесплодием. Однако в большинстве исследований главным образом указана частота транслокаций в обобщенных группах мужчин с бесплодием или с олигозооспермией без сравнения особенностей разных видов транслокаций и их частот относительно степени повреждения сперматогенеза.

Цель настоящего исследования — установить частоты транслокаций в группах мужчин с олигозооспермией тяжелой степени и азооспермией, оценить влияние разных типов хромосомных транслокаций на степень повреждения сперматогенеза, определить типы транслокаций, приводящие к полному блоку сперматогенеза.

Материалы и методы

Для характеристики спектра хромосомных мутаций у мужчин с тяжелыми формами нарушения сперматогенеза в Беларуси проводилось кариотипирование лимфоцитов периферической крови с использованием стандартной методики дифференциального окрашивания GTG-banding. Препараты метафазных хромосом получали после культивирования ФГА-стимулированных лимфоцитов в течение 72 часов. В качестве дополнительного исследования для уточнения размеров и локализации гетерохроматиновых районов хромосом использовался метод CBG-banding. Уровень разрешения микроскопирования — 550 бэндов на гаплоидный геном. Результат кариотипирования представлен согласно действующей на момент исследования номенклатуре записи кариотипа человека International System for human Cytogenetic Nomenclature (ISCN).

Группы исследования составили мужчины, проходившие обследование по направлению врача-androлога или репродуктолога в связи с бесплодием в семье. Анализ спермограммы проводился в соответствии с рекомендациями ВОЗ (согласно действующему на момент обследования изданию — № 3, 4, 5).

Показанием для кариотипирования был результат двукратного исследования эякулята с трехнедельным интервалом — тяжелые нарушения сперматогенеза — при условии исключения обструкции семявыносящих протоков. Цитогенетические исследования проводились в двух группах мужчин: с необструктивной

азооспермией (598 мужчин) и с олигозооспермией тяжелой степени (тс) (113 мужчин).

Статистический анализ осуществляли с помощью графической оболочки для работы с языком программирования R — R-Studio 3.5.1, система пакетов Tidyverse 1.2.1. Для представления номинальных данных использованы частоты: $p \pm Sp$ (относительная частота — доля, выраженная в процентах, $\pm$ стандартная ошибка доли), абсолютная частота (n — количество объектов исследования). Достоверность различий номинальных переменных оценивали с помощью критерия Пирсона χ^2 (Pearson Chi-square) и точного критерия Фишера (F-критерий). Статистически достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В генетической лаборатории ГУ «РНПЦ “Мать и дитя”» проводился ретроспективный (506 мужчин) и проспективный (205 мужчин) анализ кариотипов у мужчин с тяжелыми нарушениями сперматогенеза. Группа пациентов с необструктивной азооспермией составила 84,1% (598/711), с олигозооспермией тс — 15,9% (113/711). Средний возраст мужчин ($\pm SD$) в группе с азооспермией составил $30,4 \pm 5,3$ года (20–49), в группе с олигозооспермией тс — $32,1 \pm 5,5$ года (23–49). Необходимо отметить, что в данном случае возраст пациентов не отражает клинические или биологические аспекты бесплодия, а характеризует лишь возраст обращения за специализированной помощью и начало углубленного обследования мужского фактора бесплодия.

Согласно многочисленным исследованиям мужского фактора бесплодия у мужчин с резко сниженным числом сперматозоидов (менее 5 млн/мл) наблюдается многократно повышенная частота хромосомных мутаций по сравнению с общей популяцией. Также отмечены статистически значимые различия в частотах хромосомных аномалий между группой мужчин с олигозооспермией тс и группой мужчин с концентрацией сперматозоидов 5–15 млн/мл [5]. Для сравнения влияния разных видов хромосомных аномалий на степень повреждения сперматогенеза в табл. 1 приведены обобщенные результаты наиболее крупных исследований.

Также исследователи генетических причин мужского бесплодия не отмечают корреляции

других показателей спермограммы (объем эякулята, подвижность и морфология сперматозоидов) с носительством хромосомных аномалий. Некоторые исследователи указывают на особенности гормонального статуса (повышенные уровни фолликулстимулирующего и лютеинизирующего гормонов, сниженные показатели тестостерона) и снижение общего объема testis, как на возможные прогностиче-

ские критерии гипофункции мужских гонад, обусловленной хромосомными аномалиями [8, 12]. Учитывая данные литературы, в группы исследования в нашей работе вошли мужчины только с необструктивной азооспермией и олигозооспермией тс.

Данные кариотипирования пациентов ретроспективного и проспективного исследований представлены в табл. 2.

Таблица 1

Хромосомные аномалии у мужчин с азооспермией и олигозооспермией (обобщенные результаты разных исследований)

	Общее число хромосомных аномалий, n/%	Патология половых хромосом (число выявленных пациентов, n/%)	Патология аутосом (число выявленных пациентов, n/%)			Всего обследовано пациентов, n
			РБТ	РЦТ	Всего структурных аномалий (в т. ч. inv, mar)	
Новорожденные [4]	363/0,4	131/0,1	76/0,1	98/0,1	232/0,25	94465
Пациенты с олигозооспермией разной степени (результаты 6 исследований) [4, 10]	84/4,7	30/1,7	28/1,6	13/0,7	54/3,0	1777
Пациенты с азооспермией и олигозооспермией разной степени тяжести (результаты 6 исследований) [4]	395/5,2	296/3,9	45/0,6	32/0,4	99 /1,3	7581
Пациенты с азооспермией (результаты 8 исследований) [4, 10, 11]	226/13,4	205/12,1	3/0,2	14/0,8	21/1,2	1690

Примечание. inv — инверсия, mar — маркерная хромосома

Таблица 2

Спектр хромосомных аномалий у мужчин с тяжелыми формами нарушения сперматогенеза

Группа, человек	Всего пациентов, n	Всего выявлено патологий, n	47,XXY, n	46,XX, n	45,X/46,XY, n	47,XY, n	der (Y), n	t (X;A), n	Структурная патология аутосом, n	Сочетанный кариотип, n
Всего пациентов с азооспермией	598	110	90				11	2	6	1*
Всего пациентов с олигозооспермией тс	113	14	3				—	—	10	1**
Всего пациентов	711	124	93				11	2	16	2

Примечание. * — у пациента выявлено сочетание 2 хромосомных аномалий — кариотип 46,XXY,der(13;14); ** — у пациента выявлено сочетание 2 хромосомных аномалий — кариотип 46,XY,der(15;22)

Согласно результатам нашего исследования (табл. 2) частота аномальных кариотипов составила у мужчин с азооспермией $18,4 \pm 1,58\%$ (110/598), у мужчин с олигозооспермией тс $12,4\% \pm 3,10$ (14/113).

При сравнении полученных результатов с данными подобных исследований других авторов возникают трудности в точной оценке частот хромосомных аномалий, поскольку многие исследователи рассчитывали частоты для обобщенной группы пациентов с азооспермией и олигозооспермией разной степени тяжести или даже в общей группе бесплодных мужчин без дифференцировки по показателям спермограммы [4, 5, 7, 10, 12]. Также сложно проанализировать результаты вследствие редкости некоторых хромосомных аномалий, особенно при исследовании относительно небольших групп мужчин (менее 100). Применение разных критериев отбора в группы (например, кариотипирование только после исключения иных, кроме генетических, возможных причин бесплодия или алгоритм одновременных исследований), методологические принципы цитогенетического анализа, экологическая и географическая гетерогенность популяций также отражаются на разнице в частотах аномалий. В целом по опубликованным данным результатов кариотипирования других популяций общая частота хромосомных аномалий широко варьирует: у мужчин с азооспермией в пределах 10,0–35,0%, у мужчин с олигозооспермией тс — 0,4–13,3% [1, 3–5, 7–11, 13].

Таким образом, полученные нами частоты не противоречат результатам подобных исследований. Несмотря на то, что наблюдалась тенденция к увеличению частоты в группе мужчин с азооспермией, статистически значимых различий между двумя изучаемыми группами мужчин по частоте встречаемости хромосомной патологии не обнаружено ($\chi^2 = 1,9816$, $p = 0,159$).

В группе мужчин с азооспермией преобладают количественные и структурные аномалии половых хромосом над патологией аутосом (17,22 $\pm$ 1,54 против 1,0 $\pm$ 0,41%), в группе мужчин с олигозооспермией тс наблюдается обратная ситуация — преобладают аномалий аутосом над аномалиями половых хромосом (8,9 $\pm$ 2,67% против 2,65 $\pm$ 1,51).

Частота кариотипов со структурной патологией аутосом у мужчин с азооспермией

составила 1,0 $\pm$ 0,41% (6/598), у мужчин с олигозооспермией тс — 8,9 $\pm$ 2,67% (10/113). Повышенная частота аномалий аутосом в нашей группе мужчин с олигозооспермией тс по сравнению с результатами кариотипирования новорожденных и мужчин с олигозооспермией разной степени тяжести (табл. 1) указывает на негативные последствия структурных аномалий аутосом на сперматогенез. Установлено, что частота структурных aberrаций аутосом достоверно ниже у мужчин с азооспермией, чем у мужчин с олигозооспермией тс ($\chi^2 = 23,152$, $p < 0,001$). Согласно нашим данным есть основания полагать, что аномалии аутосом имеют более «мягкие» последствия на развитие сперматозоидов и крайне редко приводят к полному блоку сперматогенеза в отличие от аномалий половых хромосом.

В нашем исследовании 711 мужчин с нарушениями сперматогенеза были установлены следующие виды транслокаций: робертсоновские, реципрокные, транслокации с участием половой X-хромосомы. Среди 6 случаев структурной патологии аутосом в группе мужчин с азооспермией выявлены 3 транслокации, по одной инверсии, кольцевой хромосоме и маркерной хромосоме. Среди 10 случаев аутосомной патологии в группе пациентов с олигозооспермией тс выявлены 7 транслокаций и 3 инверсии. Установленные транслокации представлены в табл. 3.

После выявления структурных aberrаций у пациентов были предприняты попытки получить согласие кариотипировать родителей, но в большинстве случаев пациенты отказались травмировать близких, поэтому тип наследования не определен. По данным литературы в большинстве случаев другие члены семьи также были недоступны для кариотипирования.

Многие исследователи полагают, что аутосомные транслокации могут вызывать повреждение сперматогенеза и приводить к олигозооспермии или азооспермии. По данным различных исследований частота аутосомных транслокаций у мужчин с бесплодием широко варьирует. Такая вариабельность, как и в случае расчета частоты всех хромосомных аномалий в подобных выборках, обусловлена методологическими особенностями цитогенетических исследований (различные подходы в оценке хромосомных полиморфизмов, уро-

Таблица 3

Транслокации у пациентов с тяжелыми нарушениями сперматогенеза (результаты ретроспективного и проспективного исследований)

		Пациенты с необструктивной азооспермией	Пациенты с олигозооспермией тс
Ретроспективное исследование	Транслокации	1.46,XY,t(1;4)(p22;p16) 2.46,XY,t(2;3)(p23;p21) 3.44,XY,der(13;14)(q10;q10) der(14;21)(q10;q10)	1.45,XY,der(13;14)(q10;q10) 2.46,XXY,der(15;22)(q10;q10)
	Всего исследований	477	29
Проспективное исследование	Транслокации	1.46,Y,t(X;19)(p10;q10) 2.46,Y,t(X;7)(q22;q32)or(q26;q36)mat 3.46,XXY,der(13;14)(q10;q10)dn	1-4.45,XY,der(13;14)(q10;q10) 5.46,XY,t(1;10)(q21;q26)mat 6.46,XY,t(1;13)(q21.3;q14.1)
	Всего исследований	121	84
Частота аутомных транслокаций, %		0,7 ± 0,33 (4*/598)	7,1 ± 2,41 (8*/113)
Частота РБТ, %		0,3 ± 0,23 (2/598)	5,3 ± 2,11 (6/113)
Частота РцТ, %		0,3 ± 0,23 (2/598)	1,8 ± 1,24 (2/113)

Примечание. * — в общее число включен случай кариотипа с сочетанием двух хромосомных аномалий

вень разрешения при микрокопировании), различными критериями отбора пациентов в группы, величиной выборки. Также имеет значение популяционная, географическая, экологическая, генетическая гетерогенность. Также показано, что у части мужчин с транслокациями наблюдается нормозооспермия [14]. Так, в исследовании Vozdova et al. (2013) установлено, что у 30,8% мужчин-носителей РБТ и у 59,5% мужчин-носителей РцТ наблюдается нормозооспермия.

Обнаружены статистически достоверные различия между частотами встречаемости аутомных транслокаций в изучаемых группах мужчин — $0,7 \pm 0,33\%$ против $7,1 \pm 2,41\%$ ($p < 0,001$, F-критерий). В связи с этим можно предположить, что аутомные транслокации в основном приводят к гипосперматогенезу и в крайне редких случаях вызывают полный блок сперматогенеза.

В нашей работе РБТ выявлены у мужчин с олигозооспермией тс, в группе мужчин с азооспермией — только в сочетании с трисомией половых хромосом 46,XXY,der(13;14) и при наличии двух РБТ в одном кариотипе 44,XY,der(13;14),der(14;21). Наиболее частая (7 из 8) выявленная транслокация у мужчин с бесплодием, как и в общей популяции, —

der(13;14)(q10;q10) (табл. 3), что согласуется с данными исследований других популяций [15].

Установленная нами частота РБТ $5,3 \pm 2,11\%$ у пациентов с олигозооспермией тс в несколько раз превышает частоту РБТ 0,08–1,2% среди новорожденных [4, 16]. Наличие РБТ у мужчин с азооспермией считается крайне редким событием. Установленная частота РБТ у пациентов с азооспермией $0,3 \pm 0,23\%$ лежит в пределах частот РБТ согласно данным других исследований — менее 1% (табл. 1) [13, 16]. Обнаруженные статистически значимые различия между частотами встречаемости РБТ в изучаемых группах мужчин ($p < 0,001$, F-критерий) указывают на большую вероятность развития олигозооспермии тс, чем азооспермии при носительстве РБТ.

РцТ выявлены также в обеих группах пациентов — у мужчин с азооспермией и олигозооспермией тс. В нашем исследовании частота РцТ у мужчин с олигозооспермией тс выше, чем у мужчин с азооспермией — $1,8 \pm 1,24\%$ против $0,3 \pm 0,23\%$, что согласуется с исследованиями других авторов [14]. Однако статистически достоверных различий между частотами встречаемости РцТ в двух группах мужчин не обнаружено ($p = 0,121$, F-критерий). Если принимать во внимание, что популяционные частоты РцТ

оцениваются как 0,09–0,12% [4, 17, 18], то полученные нами частоты значительно превышают популяционную частоту.

Рассматриваются различные возможные причины нарушения сперматогенеза при аутосомных транслокациях: формирование транслокационных фигур [17], преждевременная инактивация X-хромосомы [4], локализация критичных для сперматогенеза генов на кандидатных аутосомах [19, 20], нарушение конъюгации, сегрегации хромосом [21], фрагментация ДНК [22, 23]. Таким образом, в силу перечисленных причин исследователи сделали заключение, что транслокации могут быть причиной массовой гибели клеток сперматогенного ряда и нарушения сперматогенеза у мужчин носителей [22].

При анализе структурных перестроек хромосом выявлена взаимосвязь нарушения сперматогенеза со спецификой вовлеченных в транслокации хромосом и локализацией точек разрыва. Во всех установленных нами случаях в перестройках участвовали крупные хромосомы (одна из транслоцированных хромосом относится к группам А, В). Причем в 4 выявленных случаях из 5 встретилась транслокация с участием хромосомы 1, и в 3 случаях разрыв хромосомы 1 произошел в локусе 1q21, что согласуется с данными других исследований по преобладающей частоте вовлечения хромосомы 1 в перестройки и, в частности, локуса 1q21 [10, 14, 20, 24–26].

Для выявления связи нарушения сперматогенеза с изменением целостности хромосомы 1 вероятны следующие гипотезы:

1) в течение мейоза перестроенная хромосома 1 вступает в ассоциацию с XY-бивалентом (по аналогии с другими описанными в литературе аутосомными транслокациями), что приводит к блоку сперматогенеза;

2) на хромосоме 1, вероятно, локализованы гены, ответственные за сперматогенез у мужчин; повреждение данных генов нарушает продукцию сперматозоидов;

3) характерной особенностью хромосомы 1 является крупный блок прицентромерного гетерохроматина, способный при перестройках хромосомы нарушать нормальное образование синаптонемального комплекса (например, как описано у носителей перичентрических инверсий хромосомы 1) [24].

В литературе встречаются редкие описания *транслокаций с вовлечением половых хромосом*. Исследователи, изучающие сперматогенез у мужчин носителей $t(X;A)$ (где А-аутосома), сделали вывод, что $t(X;A)$ всегда способствует нарушению сперматогенеза независимо от локализации точек разрыва на X-хромосоме [4, 15]. В большинстве случаев $t(X;A)$ у мужчин с азооспермией точки разрывов на X-хромосоме локализованы в локусах Xp22 [18, 30–32] или Xq13-q26 [15].

В нашем проспективном исследовании у двух мужчин с азооспермией выявлены транслокации с участием X-хромосомы — $t(X;19)(p10;q10)$ и $t(X;7)(q22\sim q26;q32\sim q36)mat$. При транслокации $t(X;19)(p10;q10)$ точки разрывов локализованы в области центромер, как и в описанных в литературе случаях $t(X;15)(p11.3;p11)$, $t(X;18)(q11;p11.1)$ [28], $46,Y,t(X;20)(q10;q10)$ [29]. Считается, что подобные транслокации оказывают более «мягкие» последствия на сперматогенез (не препятствуют образованию квадριвалента, прицентромерные области не содержат активных генов), вызывая олигозооспермию, когда часть зародышевых сперматогенных клеток завершают мейоз с образованием нескольких сперматозоидов с носительством транслокации [29]. Что касается азооспермии у нашего пациента с $t(X;19)(p10;q10)$, следует учитывать, что любая структурная перестройка даже в пределах одной семьи может оказывать разные эффекты на такой многоступенчатый, многофакторный и сложный процесс, как сперматогенез.

Необходимо отметить, что за время проведения исследования в нашей лаборатории больше не было выявлено случаев $t(X;A)$ у мужчин. Это характеризует данную транслокацию, как крайне редкую патологию, которая имеет негативные последствия на фертильность мужчины.

Также крайне редкими хромосомными аномалиями у человека являются транслокации между Y-хромосомой и аутосомой (за исключением транслокаций между гетерохроматиновым районом Y-хромосомы Yq12 и спутничными районами акроцентрических хромосом, которые в большинстве случаев являются семейными и не сопровождаются аномалиями фенотипа и бесплодием). В перестройках с участием Y-хромосомы главную роль в происхождении азооспермии отводят повреждению локусов

AZF (Azoospermia Factor), гены которых ответственные за процесс сперматогенеза у человека.

За время проведения нашего исследования было установлено всего 3 случая транслокаций Y-хромосомы с неacroцентрической хромосомой. Эти транслокации отсутствуют в табл. 3 и не подлежат статистической обработке в нашем исследовании в связи с тем, что данные пациенты не входили в группы исследования. Кариотип 46,Xt(Y;12)(q12;q13) установлен у мужчины с азооспермией. Кариотип 46,Xt(Y;16)(q12;q24) установлен у фертильного мужчины. Кариотипирование в данном случае проводилось в связи с выявлением данной транслокации у плода мужского пола при проведении пренатальной диагностики. В дальнейшем было показано семейное наследование перестройки, в т. ч. дериватной 16 хромосомы по женской линии. Gunel, M. et al (2008) выявили носительство t(Y;16)(q12;q13) с точками разрывов также в «генетически инертном» районе Yq12 у мужчины с азооспермией и крипторхизмом [33]. В перечисленных случаях точки разрывов на Y-хромосоме локализованы в гетерохроматиновом районе q12, локусы AZF остаются неповрежденными, что предполагает другие причины блока сперматогенеза у пациентов с азооспермией. Кариотип 47,XXt(Y;11)(p11.2~11.3;q21)dn выявлен у мальчика 15 лет, направленного на кариотипирование врачом-эндокринологом по поводу гипогонадизма, исследование спермограммы не проводилось. Окончательный диагноз пациента — синдром Клайнфельтера, носительство сбалансированной транслокации.

Установлено, что у пациентов с транслокациями с вовлечением половых хромосом во время мейоза возможны аномалии конъюгации полового пузырька. В результате экстенсивного асинописиса инактивация X-хромосомы распространяется на аутосомные районы, частично включенные в половой пузырек, что модифицирует факторы генетического фона и в дальнейшем сопровождается дегенерацией сперматоцитов после стадии пахитены и приводит к бесплодию у таких пациентов.

Наиболее интересными с цитогенетических позиций являются случаи сочетания нескольких хромосомных аномалий в одном кариотипе: 44,XY,der(13;14)(q10;q10),der(14;21)(q10;q10), 46,XXY,der(13;14)(q10;q10)dn,

46,XY,Y, der(15;22)(q10;q10), 47,XXt(Y;11)(p11.2~11.3;q21)dn. Во всех кариотипах присутствует сочетание транслокации с другой аномалией — в трех случаях с трисомией половых хромосом. При наследовании транслокации от родителей или возникновении de novo предполагается, что вторая аномалия возникла либо в той же гамете в мейозе, либо случайно в гамете противоположного пола (комплементация гамет), либо в зиготе во время митотических делений с последующей потерей первичного клона без трисомии. При происхождении двух аномалий в одной гамете (при условии возникновения структурной аномалии de novo) возникает закономерный вопрос о вероятном межхромосомном влиянии и первичности аномалии (транслокация или дисомия половых хромосом). Межхромосомные эффекты (interchromosomal effects, ICE) — нарушения мейоза, когда перестроенные хромосомы повреждают разъединение и расхождение других хромосом, не вовлеченных в перестройку. ICE можно объяснить образованием гетеросинапсиса между хромосомами, вовлеченными в перестройку, и половым пузырьком, который также может включать и другие хромосомы кроме половых [21, 34].

Межхромосомное влияние РbТ и РцТ на сегрегацию других хромосом в мейозе было экспериментально подтверждено на мышах [35]. У человека межхромосомный эффект впервые был отмечен среди отцов детей с синдромом Дауна, при кариотипировании которых наблюдалась повышенная частота РцТ [34]. В дальнейшем появились исследования, которые изучали уровни анеуплоидии сперматозоидов у носителей хромосомных aberrаций. В целом были получены противоречивые данные: некоторые исследователи отмечали ICE у мужчин с РbТ и РцТ (повышенную частоту анеуплоидии по половым хромосомам и диплоидность), другие — нет [21, 34, 36]. Однако до тех пор, пока исследователи не будут владеть данными о происхождении (материнское, отцовское) добавочных хромосом и происхождении транслокации, вопрос о существовании ICE остается открытым [35].

У мужчин с синдромом Клайнфельтера (кариотипы 46,XXY,der(13;14)(q10;q10), 47,XXt(Y;11)(p11.2~11.3;q21)) в результате преимущественной конъюгации X-хромосом и вследствие этого

малой вероятности образования полового бивалента, нарушений сегрегации половых хромосом [35] и у мужчины с носительством двух гетерозиготных Р6Т (кариотип 44,XY,der(13;14)(q10;q10), der(14;21)(q10;q10)) происходит полный блок сперматогенеза. При данном варианте носительства двух Р6Т образование сбалансированного по содержанию хромосомного материала сперматозоида маловероятно.

В случае синдрома дисомии Y-хромосомы конъюгация половых хромосом осуществляется между двумя Y-хромосомами с образованием унивалента X-хромосомы или между X-хромосомой и одной из Y-хромосом, что не препятствует образованию полового тела и нормальному завершению мейоза в процессе сперматогенеза [15, 27, 35]. У пациента с данным синдромом — кариотип 46,XY,Y, der(15;22)(q10;q10) — даже несмотря на наличие второй хромосомной аномалии в кариотипе (Р6Т) отмечено присутствие сперматозоидов в эякуляте.

Выявленные нами случаи сочетанной патологии в одном кариотипе являются крайне редкими, уникальными аномалиями. В литературе найдено лишь одно описание мужчины с сочетанной хромосомной патологией — гомозиготное носительство Р6Т 44,XY,der(14;15),der(14;15) и нормозооспермией (именно вследствие гомозиготности) [34].

Также необходимо отметить специфику типов транслокаций в исследуемых нами группах пациентов. По данным других исследований, приведенных в табл. 1, в группе мужчин с азооспермией наблюдается увеличение частоты РцТ по отношению к частоте Р6Т. В нашем исследовании у пациентов с азооспермией частоты Р6Т и РцТ оказались одинаковыми ($0,3 \pm 0,23$) в силу того, что у 2 мужчин с Р6Т одновременно в кариотипе присутствует две хромосомные аномалии (табл. 3) и образуется кариотип, имеющий заведомо негативные последствия на исход мейоза. Таким образом, можно предположить, что для полного блока сперматогенеза недостаточно наличия одной Р6Т в кариотипе мужчины, необходимо сочетание нескольких факторов (в наших случаях это присутствие нескольких аномалий в одном кариотипе). Также с азооспермией ассоциируются сочетание нескольких аномалий в одном кариотипе и транслокации с вовлечением половых хромосом (табл. 3).

Несмотря на визуально определяемые различия между частотами Р6Т и РцТ у пациентов с олигозооспермией тс, статистически достоверных различий не выявлено ($p = 0,280$, F-критерий).

Заключение

Стандартное кариотипирование в настоящее время остается первоочередным, доступным, эффективным исследованием в определении генетических причин бесплодия. Полученные нами результаты обусловлены критериями отбора врачом-андрологом пациентов для генетических исследований: данные осмотра, двукратные исследования спермограммы согласно действующим рекомендациям ВОЗ, исследования гормонов, данные УЗИ.

Ретроспективное и проспективное исследование кариотипов мужчин Беларуси с тяжелыми нарушениями сперматогенеза наряду с количественными аномалиями половых хромосом выявили значительное число структурной патологии. Установлены статистически значимые различия между группой мужчин с олигозооспермией тс и группой мужчин с азооспермией по частоте встречаемости структурной патологии аутосом, аутосомных транслокаций и, в частности, робертсоновских транслокаций. Перечисленные группы хромосомных аномалий преобладают у мужчин с олигозооспермией тс.

Анализ данных литературы и результатов нашего исследования позволяет судить о негативном влиянии на процесс сперматогенеза вплоть до полного блока следующих видов транслокаций: транслокаций с вовлечением половых хромосом, реципрокных транслокаций с вовлечением крупных хромосом, сочетании в одном кариотипе транслокации с трисомией половых хромосом (при этом нельзя исключить вероятность транслокации как первопричины для последующего образования трисомии в кариотипе).

В заключение следует подчеркнуть важность медико-генетического консультирования при выявлении носительства структурных перестроек с целью объяснения пациенту причины бесплодия в семье, оценки риска несбалансированного кариотипа у плода при наступлении беременности, выбора метода лечения бесплодия с использованием программ ВРТ.

Список использованных источников

1. The value of chromosomal analysis in oligozoospermic men / C. Stegen [et al.] // *Fertil Steril.* — 2012. — Vol. 98, № 6. — P. 1438–1442.
2. Exploring the relationship between the severity of oligozoospermia and the frequencies of sperm chromosome aneuploidies / B. Durak Aras [et al.] // *Andrologia.* — 2012. — Vol. 44, № 6. — P. 416–422.
3. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco / Y. Naasse [et al.] // *BMC Urol.* — 2015. — Vol. 15 — P. 95–101.
4. Cytogenetics of infertile men / E. Van Asche [et al.] // *Hum Reprod.* — 1996. — Vol. 11, № 4. — P. 1–24.
5. Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia / L.Y. Pylyp [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* — 2013. — Vol. 30, № 5. — P. 729–732.
6. The cytogenetic aspect of male infertility / F. Ammar-Khodja [et al.], // *Iran J Reprod Med.* — 2014. — Vol. 12, № 12. — P. 835–836.
7. Monabati, A. Cytogenetic Analysis in Infertile Male Patients with Oligospermia and Azoospermia in the Southern Region of Iran, Shiraz / A. Monabati, V. Rekabi, S. Noori // *Journal of Cancer Prevention & Current Research.* — 2016. — Vol. 6, № 3. — P. 1–5.
8. The Frequency of Chromosomal Abnormalities and Y Chromosome Microdeletions in Infertile Non-Obstructive Azoospermic and Severe Oligozoospermic Males / M.M. Abdel-Razek [et al.] // *Human Andrology.* — 2017. — Vol. 7, № 1. — P. 36–48.
9. Multicenter study of genetic abnormalities associated with severe oligospermia and non-obstructive azoospermia / C. Xie [et al.] // *J Int Med Res.* — 2018. — Vol. 46, № 1. — P. 107–114.
10. Cytogenetic analysis in infertile males with sperm anomalies / E. Etem [et al.] // *Marmara Medical Journal.* — 2009. — Vol. 22, № 3. — P. 217–224.
11. Genetic Diagnosis in Non-Obstructive Azoospermic Tunisian Men / W. Hammami [et al.] // *Austin Journal of Reproductive Medicine and Infertility.* — 2015. — Vol. 2, № 2. — P. 1012–1020.
12. Frequency of Chromosomal Abnormalities in Subpopulations of Infertile Males among Chinese Hakka Population / P. Zhao [et al.] // *Journal of Molecular and Genetic Medicine.* — 2018. — Vol. 12, № 2. — P. 1–6.
13. Chromosomal and molecular abnormalities in a group of Brazilian infertile men with severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia attending an infertility service / F.A. Mafra [et al.] // *Int Braz J Urol.* — 2011. — Vol. 37, № 2. — P. 244–251.
14. Male carriers of balanced reciprocal translocations in Northeast China: sperm count, reproductive performance, and genetic counseling / H.G. Zhang [et al.] // *Genet Mol Res.* — 2015. — Vol. 14, № 4. — P. 18792–18798.
15. Gersen, S.L. The principles of clinical cytogenetics / S.L. Gersen, M.B. Keagle. — 3rd ed. — Springer: USA, 2013. — 569 p.
16. Robertsonian translocation associated with azoospermia / I. Sasagawa [et al.] // *Urol Int.* — 1989. — Vol. 44, № 6. — P. 379–80.
17. Harton, G.L. Chromosomal disorders and male infertility // G.L. Harton, H.G. Tempest // *Asian J Androl.* — 2012. — Vol. 14, № 1. — P. 32–39.
18. The case of an infertile male with an uncommon reciprocal X-autosomal translocation: how does this affect male fertility? / K. Karaer [et al.] // *Genet Couns.* — 2010. — Vol. 21, № 4. — P. 397–404.
19. Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle / J.M. Luciani [et al.] // *Cytogenet Cell Genet.* — 1984. — Vol. 38, № 1. — P. 14–22.
20. Autosomal aberrations associated with testicular dysgenesis or spermatogenic arrest in Chinese patients / J.H Guo. [et al.] // *Asian J Androl.* — 2002. — Vol. 4, № 1. — P. 3–7.
21. Abnormal synapses and recombination in an azoospermic male carrier of a reciprocal translocation t(1;21) / M. Leng [et al.] // *Fertil Steril.* — 2009. — Vol. 91, № 4. — P. 1293–1296.
22. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality / A. Perrin [et al.] // *Fertil Steril.* — 2009. — Vol. 92, № 2. — P. 583–589.
23. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients / F. Brugnol [et al.] // *Hum Reprod.* — 2006. — Vol. 21, № 3. — P. 685–693.

24. An excess of chromosome 1 breakpoints in male infertility / I. Bache [et al.] // *Eur J Hum Genet.* — 2004. — Vol. 12, № 12. — P. 993–1000.
25. Translocation breakpoints of chromosome 1 in male carriers: clinical features and implications for genetic counseling / R.X. Wang [et al.] // *Genet Mol Res.* — 2016. — Vol. 15, № 4. — P. 115–118.
26. Identification of human candidate genes for male infertility by digital differential display / C. Olesen [et al.] // *Mol Hum Reprod.* — 2001. — Vol. 7, № 1. — P. 11–20.
27. Ньюссбаум, Р.Л. Медицинская генетика / Р.Л. Ньюссбаум, Р.Р. Мак-Иннес, and Х.Ф. Виллард. — Москва: «ГЭОТАР-Медиа», 2010. — 624 с.
28. Segregation of chromosomes in sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother: case report / A. Perrin [et al.] // *Hum Reprod.* — 2008. — Vol. 23, № 1. — P. 227–230.
29. ICSI and the transmission of X-autosomal translocation: a three-generation evaluation of X;20 translocation: case report / S. Ma [et al.] // *Hum Reprod.* — 2003. — Vol. 18, № 7. — P. 1377–1382.
30. A Rare Inherited Reciprocal Translocation Found in Two Male Infertile Siblings / M. Alhalabi [et al.] // *Journal of Fertilization: In Vitro, IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology.* — 2014. — Vol. 2, № 1. — P. 103–107.
31. Familial chromosomal translocation X; 22 associated with infertility and recurrent X mosaicism / J.D. Grzesiuk [et al.] // *Mol Cytogenet.* — 2016. — Vol. 9. — P. 45–47.
32. Association between male infertility and X;22 translocation. Материалы 2 цитогенетической конференции. — Бразилия, 2011.
33. Azoospermia and cryptorchidism in a male with a de novo reciprocal t(Y;16) translocation / M. Gunel [et al.] // *Genet Couns.* — 2008. — Vol. 19, № 3. — P. 277–280.
34. Analysis of meiotic segregation patterns and interchromosomal effects in sperm from a Robertsonian translocation family / S. Xu [et al.] // *Biomedical Research.* — 2014. — Vol. 25, № 2. — P. 233–239.
35. Баранов, В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова. — Санкт-Петербург: Издательство Н.-Л., 2007. — 640 с.
36. Martin, R.H. Cytogenetic determinants of male fertility / R.H. Martin // *Hum Reprod Update.* — 2008. — Vol. 14, № 4. — P. 379–390.

E.G. Trebka¹, A.V. Bahachova², N.B. Gusina¹

CHROMOSOMAL TRANSLOCATIONS AS THE CAUSE OF SEVERE OLIGOZOOSPERMIA AND NON-OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIA IN MEN

¹Republican Scientific and Practical Center “Mother and child”

Minsk, 220053, the Republic of Belarus

²Belarusian State University

Minsk, 220045, the Republic of Belarus

The Article presents the investigation results on the frequency of different types of chromosomal translocations in the groups of patients with severe oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. The translocation carriage effect on the degree of spermatogenesis damage in males is discussed. The data obtained indicate a negative impact on the spermatogenesis of translocations involving sex chromosomes, reciprocal translocations involving large chromosomes, the combination of translocation with a sex chromosomes' trisomy as part of one karyotype.

Key words: oligozoospermia, non-obstructive azoospermia, karyotype, translocation.

Дата поступления статьи: 31 января 2019 г.

А.А. Гусина, Н.Б. Гусина, И.В. Наумчик, Н.В. Румянцева, В.Д. Кулак, И.Н. Мотюк, Е.С. Будейко,
С.О. Мясников, К.А. Криницкая, А.С. Сталыбко

НОВЫЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *GNPTAB* ПРИ МУКОЛИПИДОЗЕ II АЛЬФА/БЕТА У ЖИТЕЛЕЙ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»
Республика Беларусь, 220053, Минск, ул. Орловская, 66, корп. 9
e-mail: asya.gusina@mail.ru

Муколипидоз II альфа/бета (МЛ IIА/В) — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене *GNPTAB*. В работе сообщается о новых, не описанных ранее в литературе, мутациях с.1450_1451insT и с.1503_1521dup (NG_021243.1) в 12 экзоне гена *GNPTAB*, обнаруженных у пациентов с МЛ IIА/В в Республике Беларусь.

Ключевые слова: муколипидоз II-III типа, мутации в гене *GNPTAB*, неонатальный муколипидоз IIА/В.

Введение

Муколипидозы II–III типов — заболевания, возникающие в результате мутаций генов *GNPTAB* и *GNPTG* [1, 2]. Эти гены кодируют синтез фермента UDP-GlcNAc 1-фосфотрансферазы (уридилдифосфат-N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы), который представляет собой гексамерный комплекс, состоящий из двух альфа, двух бета и двух гамма субъединиц [3]. Субъединицы альфа и бета этого энзима кодирует ген *GNPTAB* [4], а субъединицу гамма — ген *GNPTG* [5]. Альфа и бета субъединицы синтезируются в виде единого неактивного предшественника. В аппарате Гольджи молекула-предшественник подвергается протеолитическому расщеплению между остатками аминокислот 928 и 929 с образованием активных субъединиц фермента [6]. Дефицит активности UDP-GlcNAc 1-фосфотрансферазы приводит к нарушению формирования специфических сайтов, которые обеспечивают «узнавание» и транспорт лизосомных ферментов в лизосомы. В результате лизосомные гидролазы не проникают в лизосомы, а выделяются из клеток и обнаруживаются в различных биологических жидкостях, в частности, в плазме крови. При этом в лизосомах накапливаются нерасщепленные субстраты этих ферментов, что и приводит к формированию фенотипа болезни накопления. Мутации в гене *GNPTAB* приводят к развитию муколипидоза II альфа/бета (МЛ IIА/В) или муколипидоза III альфа/бета (МЛ

IIIА/В), а повреждения гена *GNPTG* ассоциированы с муколипидозом III гамма. Ген *GNPTAB* картирован на длинном плече 12 хромосомы (12q23.3) и состоит из 21 экзона. В настоящее время в гене *GNPTAB* описано 169 мутаций [7]. Наиболее частым повреждением гена *GNPTAB* у пациентов в европейских странах, США и России является делеция двух нуклеотидов в 19 экзоне гена с.3503–3504delTC [7, 8, 9, 10]. В этой работе мы сообщаем о новых мутациях в гене *GNPTAB*, обнаруженных в семьях пациентов с МЛ IIА/В в Республике Беларусь.

Цель исследования — установить мутации в гене *GNPTAB* у пациентов с муколипидозом II типа и в их семьях.

Материалы и методы

Объект исследования — пациенты с подтвержденным диагнозом «муколипидоз» и их семьи.

В исследуемую группу включены 3 семьи, имеющие ребенка с подтвержденным диагнозом «муколипидоз II тип» (3 пробанда: 1 девочка, 2 мальчика, 3 родителя и 4 здоровых сибса).

Семья 1. Пробанд 1 родилась от второй беременности у молодых здоровых супругов, состоящих в неродственном браке. От первой беременности супруги имеют здорового ребенка мужского пола. Пробанд родилась в состоянии тяжелой асфиксии с оценкой по Апгар 6/2 и была переведена на искусственную вентиляцию легких. Масса ребенка при рождении

2660 г, длина тела 50 см, окружность головы 33 см, окружность грудной клетки 29 см. У девочки отметили черепно-лицевые дисморфии (капиллярную гемангиому на лбу, высокий лоб, плоские надбровья, дуговые брови, плоское запавшее переносье, малый курносый нос, микрогению), узкую грудную клетку, укорочение и деформацию конечностей, контрактуры в крупных суставах, аномалии ногтевых пластинок пальцев кистей и стоп, плоско-вальгусную позицию стоп, внутриутробные переломы длинных трубчатых костей, кардиомегалию. В связи с наличием переломов длинных трубчатых костей пациентке первоначально был выставлен диагноз несовершенного остеогенеза. При ультразвуковом исследовании (УЗИ) головного мозга установлено выраженное усиление эхогенности перивентрикулярных зон. При УЗИ органов брюшной полости патологии не было обнаружено. Лабораторное исследование выявило увеличение активности лизосомных ферментов, хитотриозидазы, а также кислой и щелочной фосфатазы при нормальных значениях концентрации кальция и фосфора в сыворотке крови, что представлено в табл. 1.

На основании повышения активности нескольких лизосомных ферментов в плазме крови у девочки был диагностирован МЛ II типа.

Более подробные сведения об этой пациентке, включая данные патологоанатомического за-

ключения, содержатся в статье Румянцевой Н.В. и соавторов [11].

В последующем семья дважды обращалась в РНПЦ «Мать и дитя» для проведения пренатальной диагностики. Результаты лабораторных исследований представлены в табл. 2. Беременности завершились рождением здоровых детей мужского пола.

Семья 2. Пробанд 2 впервые был осмотрен врачом-генетиком в возрасте 1 года 6 месяцев в связи с задержкой психомоторного развития и контрактурами суставов. При анализе родословной установлено, что родители мальчика молодые и здоровые, брак неродственный, однако оба супруга родом из одного населенного пункта. Первая беременность в этой семье завершилась мертворождением плода мужского пола массой 2100 г с врожденными пороками развития. Пробанд родился от второй беременности в сроке 40 недель, с массой 2700 г и длиной тела 49 см. Течение беременности осложнилось токсикозом первой половины и угрозой самопроизвольного прерывания во втором триместре, потребовавшей стационарного лечения.

В возрасте шести месяцев в связи с задержкой моторного развития и тугоподвижностью суставов проведена консультация ортопеда и невролога. В возрасте 1 года и 1 месяца ребенок находился на стационарном лечении с диагнозом детский церебральный паралич,

Таблица 1

Активность лизосомных ферментов, хитотриозидазы, кислой и щелочной фосфатазы в плазме крови пациентки

Показатель	Пробанд 1	Область нормальных значений
Бета-галактозидаза, нмоль/ч/мл	103	5–50
Альфа-маннозидаза, нмоль/ч/мл	2484	15–45
Альфа-фукозидоза, нмоль/ч/мл	6552	540–1200
Арилсульфатаза А, нмоль/ч/мл	210	<22
Бета-гексозаминидаза общая, нмоль/ч/мл	12834	500–1500
Бета-глюкуронидаза, нмоль/ч/мл	2803	80–360
Щелочная фосфатаза, нмоль/ч/мл	1823,1	<600
Кислая фосфатаза, Ед/л	8,36	<6,5
Хитотриозидаза, нмоль/ч/мл	238	4–32

Таблица 2

Активность лизосомных ферментов в амниотической жидкости и амниоцитах плодов

Фермент	Активность в амниотической жидкости, нмоль/ч/мл; активность в амниоцитах, нмоль/ч/мг белка	
	Плод 1/ контроль 1/ контроль 2/ амниоциты плода	Плод 2/ контроль 1/ контроль 2/ амниоциты плода
Бета-глюкуронидаза	70/40/91/-	7,9/11,5/17,3/221
Бета-галактозидаза	626/426/814/3,8	10,0/9,3/8,5/1039
Альфа-маннозидаза	61/44/131/7,62	7,6/10,2/11,3/377
Бета-гексозаминидаза А	5496/3619/5835/457	571/213/398/3526
Арилсульфатаза А	35/22/63,8/5,3	7,1/6,8/7,3/66
Бета-маннозидаза	—	25,8/19/20,3/-

двойная спастическая диплегия 2–3 степени, задержка речевого развития. Отмечены задержка психомоторного развития (отсутствие навыков самостоятельной ходьбы, речи), контрактуры коленных, локтевых, голеностопных суставов. В биохимическом анализе крови выявлено увеличение активности щелочной фосфатазы до 617,5 ЕД/л (норма менее 350 ЕД/л) при нормальных значениях концентрации кальция — 2,7 ммоль/л и фосфора — 1,27 ммоль/л. При магнитно-резонансной томографии головного мозга выявлена полимикририя с выраженной внутренней гидроцефалией. При осмотре офтальмологом констатирована гипопигментация сетчатки. При цитогенетическом исследовании установлен нормальный мужской кариотип — 46 XY. По результатам селективного скрининга на наследственные болезни обмена веществ уровень экскреции гликозаминогликанов (ГАГ) с мочой соответствует возрастной норме, однако при двумерном электрофорезе ГАГ мочи выявлены патологические ГАГ: гепарансульфат — 15%, дерматансульфат — 3%. Проба на олигосахариды в моче оказалась положительной. При осмотре пробанда врачом-генетиком в возрасте 1 года 6 месяцев установлена задержка физического развития: масса тела ребенка 9 кг (менее 3-го перцентиля), рост 73 см (менее 3-го перцентиля). Окружность головы 47,5 см (25 перцентиль). Отмечена задержка психомоторного развития: ребенок не может самостоятельно стоять, ходить, не говорит, однако знает родителей. При осмо-

тре у мальчика выявлены черепно-лицевые дисморфии (долихоцефалия, выпуклый лоб, широкое, несколько запавшее переносье, вздернутый нос, грубые черты лица), короткая шея, «бочкообразная» грудная клетка, широкие кисти, брахидактилия, тугоподвижность межфаланговых суставов, вальгусные стопы. При рентгенографии кистей отмечено, что пястные кости укорочены, широкие с деформированными эпифизами, фаланги укорочены, конической формы. При аускультации сердца выслушивался систолический шум. Печень и селезенка не были увеличены. Определялся диастаз мышц живота, двусторонняя оперированная паховая грыжа. При УЗИ органов брюшной полости патологии не выявлено. При лабораторном исследовании установлено увеличение активности арилсульфатазы А в плазме крови до 600 Ед (норма 11-33), щелочной фосфатазы 1520 ЕД/л (норма до 670) при нормальных значениях показателей минерального обмена: кальций 2,41 ммоль/л, фосфор 1,78 ммоль/л. Экскреция свободных и связанных сиаловых кислот с мочой оказалась повышенной: 6,23 и 12,0 ммоль/г креатинина при норме $0,837 \pm 0,430$ и $1,287 \pm 0,689$ ммоль/г креатинина соответственно. Активность лизосомных ферментов в плазме крови пациента была значительно увеличена (табл. 3), что позволило диагностировать МЛ II типа.

Продолжительность жизни пробанда составила 4 года 7 месяцев. Аутопсия не проводилась по настоянию семьи.

После установления диагноза аутосомно-рецессивного заболевания семья дважды обращалась за проведением пренатальной диагностики. Результаты этих исследований представлены в табл. 4. В первом случае у плода был установлен муколипидоз II типа, и беременность была прервана. Следующая беременность завершилась рождением здоровой девочки.

Семья 3. Пробанд 3 впервые проконсультирован врачом-генетиком в возрасте 1 года. При осмотре отмечены: брахицефалия, уплощенный затылок, низко расположенные ушные раковины, широкая спинка носа, гипертрофия десен, сухая кожа с элементами распространенного дерматита, кифоз, воронкообразная грудная клетка, утолщения на ребрах, напоминающие

«рахитические четки», контрактуры межфаланговых суставов, диастаз прямых мышц живота, гепато- и спленоmegалия. При лабораторном исследовании выявлено увеличение активности лизосомных ферментов в сыворотке крови, что позволило установить диагноз МЛ II типа. К сожалению, дальнейшее наблюдение за этим пациентом оказалось невозможным, поскольку после окончания стационарного лечения семья на контрольный осмотр к врачу-генетику не явилась и на последующие приглашения на медико-генетическую консультацию не ответила.

Молекулярно-генетические исследования для поиска мутаций в гене *GNPTAB* были выполнены обоим родителям и сибсам пробанда 1, матери и сестре пробанда 2, а также пробанду 3.

Таблица 3

Активность лизосомных ферментов в плазме крови пациента 2

Фермент	Активность в плазме крови, нмоль/ч на мл	
	Пробанд 2	Область нормальных значений
Бета-галактозидаза	32	6–36
Альфа-маннозидаза	3335	22–10
N-ацетилглюкозаминидаза	214	11,18–42
Арилсульфатаза А	585	6–12
Бета-глюкуронидаза	4665	10–66

Таблица 4

Активность лизосомных ферментов в амниотической жидкости и амниоцитах

Фермент	Активность в амниотической жидкости, нмоль/ч на мл	
	Плод 1/ контроль 1/ контроль 2/ контроль 3	Плод 2/ контроль 1/ контроль 2/ контроль 3
Бета-глюкуронидаза	448/60/63/47	29/19/25/32
Бета-галактозидаза	20/-/9,0	5,8/3,4/4,6/4,9
Альфа-маннозидаза	801/32/32/26	10,3/8,5/9,3/14
Бета-маннозидаза	382/66/114/106	25/33/30/38
Альфа-фукозидаза	935/122/124/244	—
Бета-гексозаминидаза А	11561/1891/2222/1451	542/523/817/1928
Арилсульфатаза А	29/3,6/5,7/3,0	3,3/3,0/3,1/5,6

В качестве материала для исследования использовали образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов методом солевой экстракции [12].

Анализ нуклеотидной последовательности гена *GNPTAB* проведен методом прямого секвенирования на автоматическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems). Амплификация экзонов гена проводилась с помощью олиго-

нуклеотидных праймеров, предложенных Сур и соавторами [10]. Результаты секвенирования представлены на рис. 1, 2, 5, 6.

Результаты и обсуждение

В результате секвенирования экзонов гена *GNPTAB* у отца и старшего брата пробанда 1 была выявлена мутация p.S738X в 13 экзоне

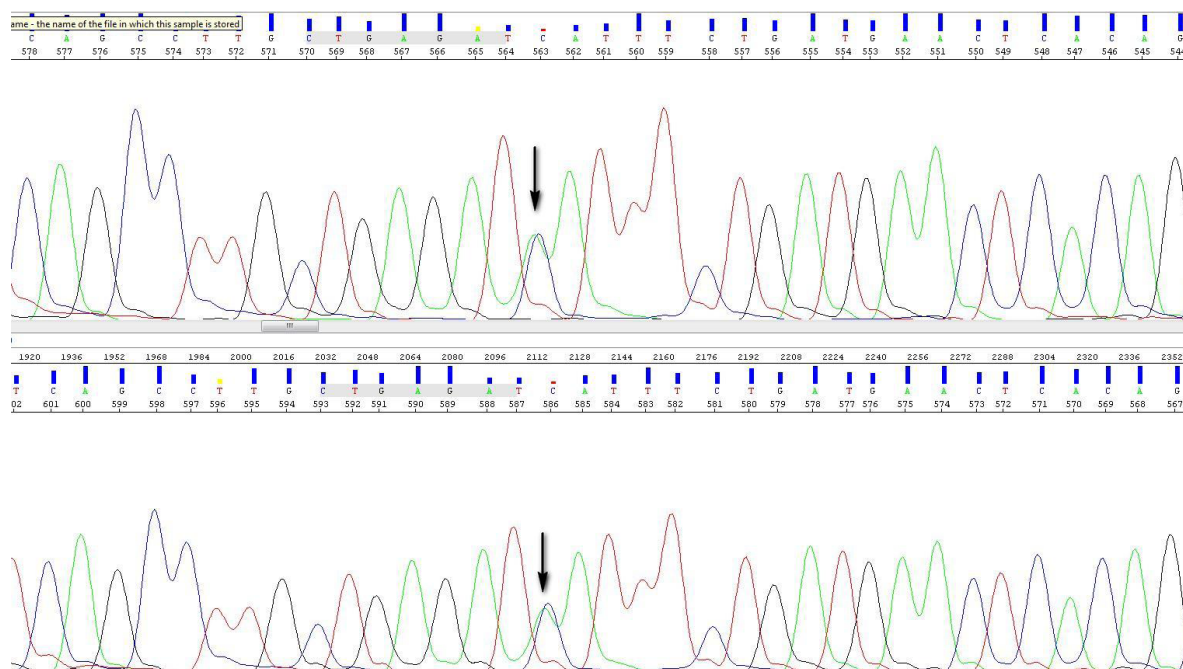


Рис. 1. Мутация p.S738X в 13 экзоне гена *GNPTAB* в гетерозиготном состоянии у отца и старшего брата пробанда 1

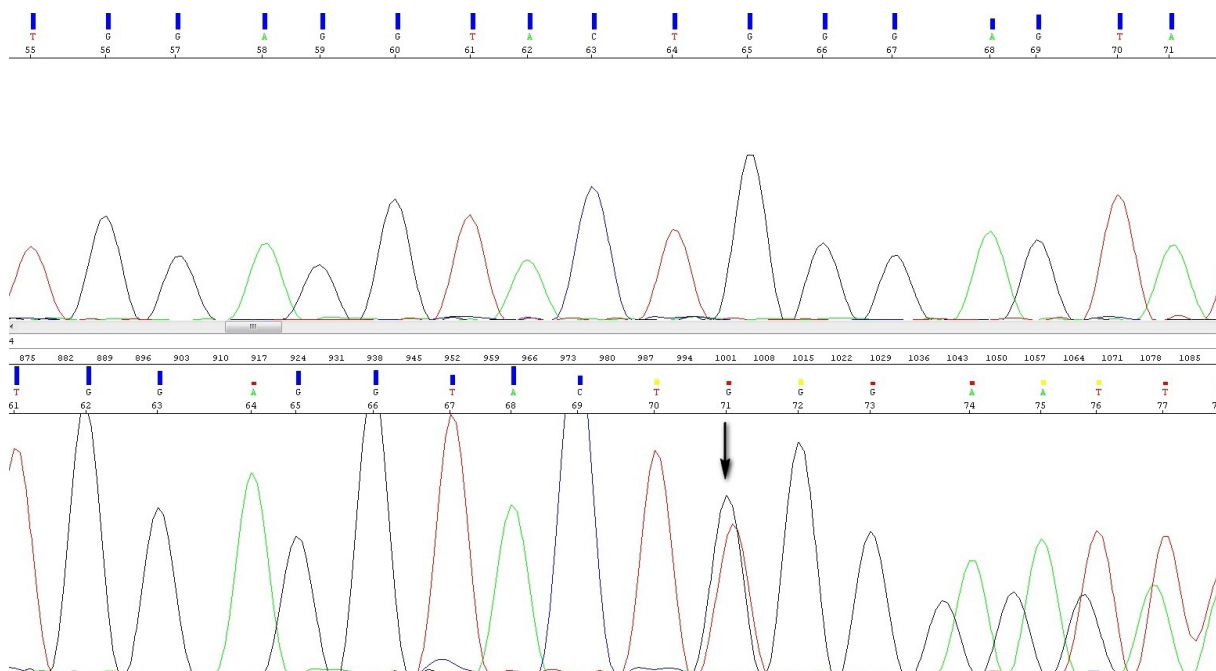


Рис. 2. Мутация c.1450_1451insT в 12 экзоне гена *GNPTAB* в гетерозиготном состоянии у матери пробанда 1

гена *GNPTAB*, что представлено на рис. 1. У матери и двух младших братьев пробанда 1 была обнаружена инсерция одного нуклеотида в 12 экзоне гена NG_021243.1 (*GNPTAB*_v001):c.1450_1451insT, что отражено на рис. 2.

Родословная семьи 1 представлена на рис. 3.

Очевидно, пробанд 1 являлась компаундным гетерозиготным носителем нонсенс-мутации в 13 экзоне и мутации со сдвигом рамки считывания в 12 экзоне гена *GNPTAB*. Мутация c.1451_1452insT в гетерозиготном состоянии была выявлена также у матери пробанда 2. У ее дочери мутации в гене *GNPTAB*

не обнаружены. При изучении семейного анамнеза выяснилось, что матери пробандов 1 и 2 и их родители происходят из одного района Беларуси. Отец пробанда 2 также родился в этом районе, что позволяет предположить, что он также был носителем мутации c.1451_1452insT, и развитие заболевания у пробанда 2 было обусловлено гомозиготным носительством этой мутации. К сожалению, отец пробанда 2 и его родители умерли, и мы не смогли проверить правильность этого суждения. Родословная семьи 2 представлена на рис. 4.

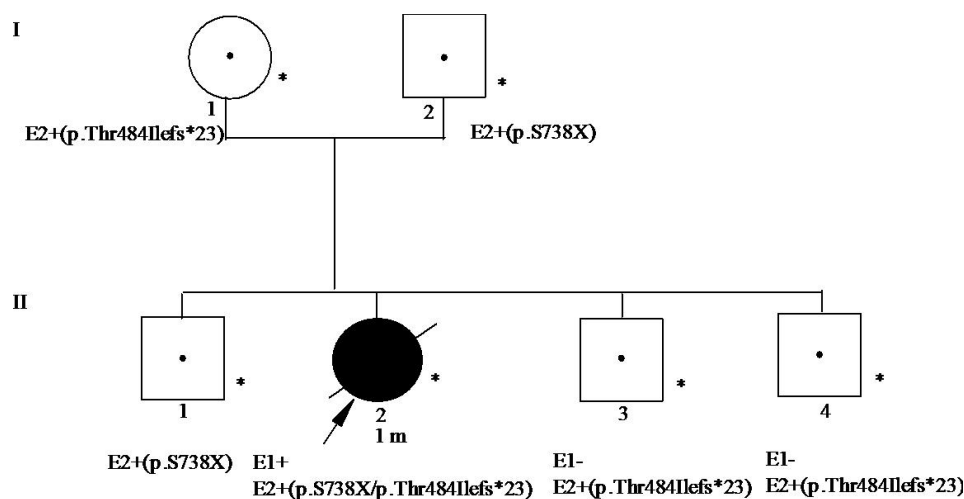


Рис. 3. Родословная семьи 1

1 m — возраст пробанда 1 на момент смерти — 1 месяц, E1 — исследование активности лизосомных ферментов, E2 — секвенирование гена *GNPTAB*, * — исследование документально подтверждено, II.2 — МЛ ПА/В, II.3, II.4 — пренатальная диагностика

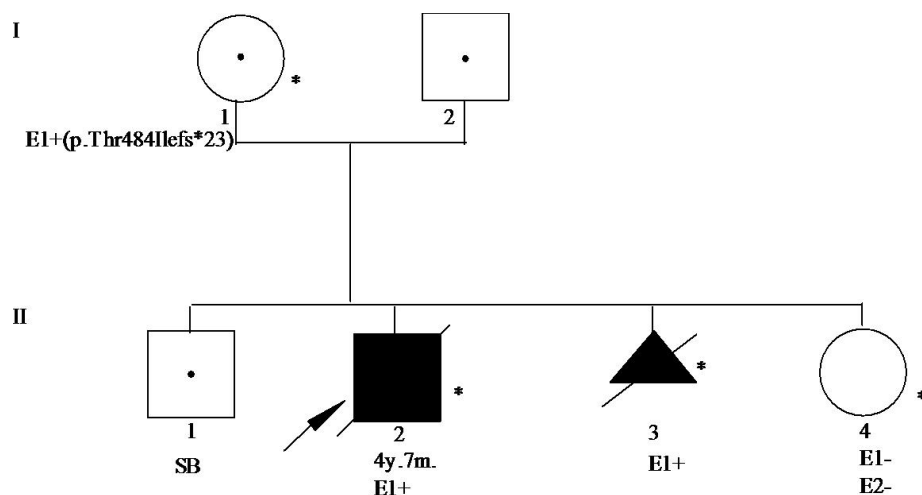


Рис. 4. Родословная семьи 2

SB — мертворождение, 4y.7m — возраст пробанда 2 на момент смерти 4 года 7 месяцев, E1 — исследование активности лизосомных ферментов, E2 — секвенирование гена *GNPTAB*, * — исследование документально подтверждено, II.1 — пороки развития у плода, II.2 — МЛ ПА/В, II.3, II.4 — пренатальная диагностика

У пробанда 3 выявлено компаундное гетерозиготное носительство мутации p.Arg375X в 10 экзоне и дупликации 19 пар оснований в 12 экзоне гена *GNPTAB* 1503_1521dup (NG_021243.1), что представлено на рис. 5 и 6.

Мутация p.S738X была впервые описана А.Н. Семячкиной и соавторами в 2017 г. у пациентов с муколипидозом II–III типов жителей России. Действительно, отец пробанда 1 — русский. Мутация p.S738X является вторым после мутации c.3503-3504del TC частым повреждением гена *GNPTAB* в России — на ее долю приходится 21% мутантных аллелей [7]. Согласно наблюдениям А.Н. Семячкиной и соавторов, эта мутация в гомозиготном состоянии или в сочетании с другой нонсенс-мутацией, или мутацией со сдвигом рамки считывания ассоциирована с тяжелой формой заболевания — МЛ ПА/В, для которой характерны манифестация

с рождения, прогрессирующее течение и летальный исход на первом десятилетии жизни вследствие поражения бронхолегочной и сердечно-сосудистой систем. Сочетание p.S738X с миссенс-мутациями может приводить к развитию более мягкого фенотипа — МЛ III А/В. Первые симптомы при этой форме муколипидоза появляются в среднем в возрасте трех лет, заболевание прогрессирует медленно, патологический процесс затрагивает преимущественно скелет и сердечно-сосудистую систему. Интеллект большинства пациентов сохранен, а прогноз для жизни благоприятный.

Мутация c.1451_1452insT приводит к замещению остатка треонина в позиции 484 на изолейцин и образованию преждевременного стоп-кодона в позиции 506. Мутация является новой, не описанной ранее в литературе. Очевидно, что наличие этой мутации также

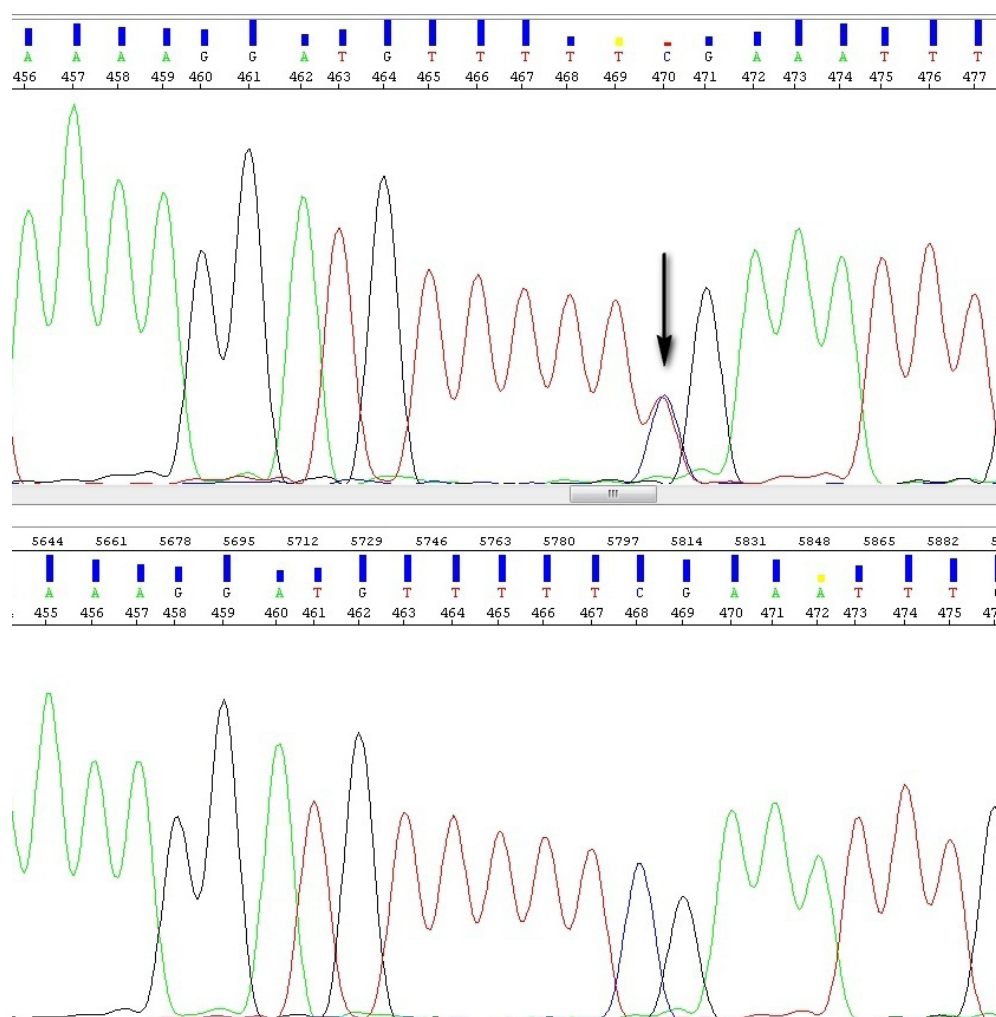


Рис. 5. Мутация p.Arg375X в 10 экзоне гена *GNPTAB* в гетерозиготном состоянии (отмечена стрелкой) у пробанда 3

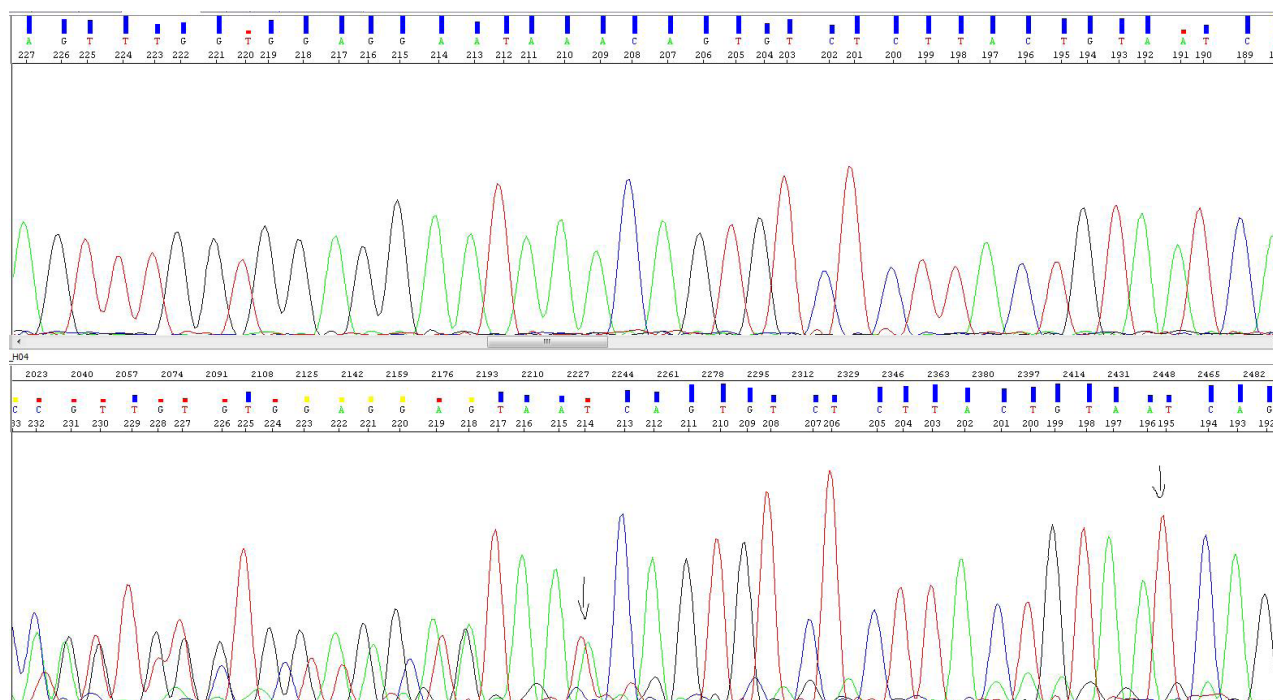


Рис. 6. Мутация с.1503_1521dup в гетерозиготном состоянии у пробанда 3 (нижняя дорожка). Стрелками показан дуплицированный фрагмент. Реакция секвенирования с реверсным праймером

сопряжено с развитием МЛ ПА/В. У пробанда 1 заболевание манифестировало с рождения и привело к летальному исходу в возрасте 1 месяца, что однозначно позволяет классифицировать этот случай как МЛ ПА/В. У пробанда 2 первые признаки заболевания были замечены на втором полугодии жизни. В этом возрасте может манифестировать МЛ III А/В с тяжелым течением, однако выраженная задержка физического и психомоторного развития и летальный исход в возрасте 4 лет 7 месяцев свидетельствуют в пользу МЛ ПА/В.

Мутация p.Arg375X была впервые описана Tarrino и соавторами в 2009 г. у двух пациентов итальянского происхождения с фенотипом муколипидоза III альфа/бета с тяжелым течением [13]. По данным российских исследователей p.Arg375X является частым повреждением гена *GNPTAB* у пациентов с муколипидозом в России — на ее долю приходится 18,6% мутантных аллелей [6]. В европейских странах и США эта мутация встречается, по-видимому, редко [8, 10]. Из нашего опыта известно, что мутация p.Arg375X является самой частой у пациентов с МЛ II–III в Беларуси — на ее долю приходится 50% мутантных аллелей гена.

Мутация с.1503_1521dup приводит к замене остатка глутаминовой кислоты в позиции

508 на остаток цистеина и образованию преждевременного стоп кодона в позиции 513. Мутация является новой, не описанной ранее в литературе, и, по-видимому, ассоциирована с развитием МЛ II типа. Случай пациента 3 с учетом ранней манифестации и наличия гепатоспленомегалии также классифицирован нами как МЛ ПА/В.

По данным многочисленных исследователей, гомозиготное и компаундное гетерозиготное носительство нонсенс-мутаций и мутаций со сдвигом рамки считывания приводит к развитию МЛ ПА/В или МЛ IIIА/В с манифестацией на первом году жизни, тяжелым течением и гибелью пациентов на первой декаде жизни [7–10], что подтверждают и описываемые наблюдения.

В исследованиях последних лет было показано, что мутации со сдвигом рамки считывания и нонсенс мутации в гене *GNPTAB* приводят к тому, что синтезированный белок-предшественник альфа- и бета-субъединиц не попадает из эндоплазматической сети в аппарат Гольджи и, соответственно, не подвергается протеолитической активации. В результате ферментативная активность UDP-GlcNAc 1-фосфотрансферазы полностью утрачивается и развивается тяжелая форма заболевания [7, 14].

Заключение

МЛ ПА/В — редкое наследственное заболевание, обусловленное мутациями в гене *GNPTAB*. Нам удалось обнаружить у пациентов с МЛ ПА/В жителей Республики Беларусь две новые, не описанные ранее в литературе, мутации в 12 экзоне гена *GNPTAB*: с.1450_1451insT и с.1503_1521dup (NG_021243.1).

Список литературы

1. Leroy, J.G. (2012) Mucopolipidosis II [Electronic resource] / GeneReviews. — Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1828>. — Date of access: 6.04.2018.
2. Leroy, J.G. (2012) Mucopolipidosis III Alpha/Beta [Electronic resource] / GeneReviews. — Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1875/>. — Date of access: 6.04.2018.
3. Bao, M., Booth, J.L., Elmendorf, B.J., Canfield, W.M. Bovine UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. I. Purification and subunit structure. — J Biol Chem, 1996. — Vol. 271, № 49. — P. 31437–31445. — doi: 10.1074/jbc.271.49.31437.
4. Kudo, M., Bao, M., D'Souza, A., Ying, F., Pan, H., Roe, B.A., Canfield, W.M. The α - and β -subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal enzyme N-acetyl-1-phosphotransferase are encoded by a single cDNA. — J. Biol. Chem., 2005. — Vol. 280. — P. 36141–36149.
5. Cathey, S.S., Kudo, M., Tiede, S., Raas-Rothschild, A., Braulke, T., Beck, M., Taylor, H.A., Canfield, W.M., Leroy, J.G., Neufeld, E.F., McKusick, V.A. Molecular order in mucopolipidosis II and III nomenclature. — Am J Med Genet Part A, 2008. — Vol. 146A. — P. 512–513.
6. Velho, R.V., De Pace, R., Klünder, S. Analyses of disease-related *GNPTAB* mutations define a novel GlcNAc-1-phosphotransferase interaction domain and an alternative site-1 protease cleavage site. — Hum Mol Genet., 2015. — Vol. 24, № 12. — P. 3497–3505.
7. Семячкина, А.Н., Воскобоева, Е.Ю., Букина, Т.М., Букина, А.Н., Николаева, Е.А., Данцев, И.С., Харабадзе, М.Н., Давыдова, Ю.И. Клинико-генетическая характеристика муколипидоза II и IIIA типов у детей. — Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2017. — Т. 62, № 3. — С.71–78.
8. Cathey, S., Leroy, J.G., Wood, T. Phenotype and genotype in mucopolipidoses II and III alpha/beta: a study of 61 probands. — Med. Genet., 2010. — Vol. 47, № 1. — P. 38–48. — doi:10.1136/jmg.2009.067736.
9. Encarnação, M., Lacerda, L., Costa, R., Prata, M.J., Coutinho, M.F., Ribeiro, H., Lopes, L., Pineda, M., Ignatius, J., Galvez, H., Mustonen, A., Vieira, P., Lima, M.R., Alves, S. Molecular analysis of the *GNPTAB* and *GNPTG* genes in 13 patients with mucopolipidosis type II or type III — identification of eight novel mutations. — Clin. Genet., 2009. — Vol. 76. — P. 76–84.
10. Cury, G.K., Matte, U., Artigalás, O., Alegria, T., Velho, R.V., Sperb, F., Burin, M.G., Ribeiro, E.M., Lourenço, C.M., Kim, C.A., Valadares, E.R., Galera, M.F., Acosta, A.X., Schwartz, I.V. Mucopolipidosis II and III alpha/beta in Brazil: analysis of the *GNPTAB* gene. — Gene, 2013. — Vol. 524. — P. 59–64. — doi: 10.1016/j.gene.2013.03.105.
11. Румянцева, Н. В., Наумчик, И.В., Гусина, Н.Б., Будейко, Е.С., Кулак, В.Д., Савенко, Л.А., Качан, Ю.П., Солнцева, А. В., Клецкий, С.К., Бойцко, М.Ю. Муколипидозы: клинико-генетические характеристики, медико-генетическое консультирование, профилактика. — Ars medica, 2012. — Vol. 7. — P. 86–93.
12. Aljanabi, S.M., Martinez, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. — Nucleic Acids Res., 1997. — Vol. 25, № 22. — P. 4692–4693.
13. Tappino, B., Chuzhanova, N.A., Regis, S., Dardis, A., Corsolini, F., Stroppiano, M., Tonoli, E., Beccari, T., Rosano, C., Mucha, J., Blanco, M., Szlago, M., Di Rocco, M., Cooper, D.N., Filocamo, M. Molecular characterization of 22 novel UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase alpha- and beta-subunit (*GNPTAB*) gene mutations causing mucopolipidosis types IIalpha/beta and IIIalpha/beta in 46 patients. — Hum Mutat, 2009. — Vol. 30. — P. 956–973. — doi: 10.1002/humu.21099.
14. De Pace, R., Coutinho, M.F., Koch-Nolte, F., Haag, F., Prata, M.J., Alves, S., Braulke, T., Pohl, S. Mucopolipidosis II-related mutations inhibit the exit from the endoplasmic reticulum and

proteolytic cleavage of GlcNAc-1-phosphotransferase precursor protein (*GNPTAB*). — Hum Mutat, 2014. — Vol. 35, № 3. — P. 368–376. — doi: 10.1002/humu.22502.

A.A. Gusina, N.B. Gusina, V.D. Kulak, I.V. Naumchik, N.V. Rumyantseva, I.N. Motyuk, A.S. Budzeika, S.O. Miasnikov, K.A. Krinitskaya, A.S. Stalybko

NOVEL *GNPTAB* GENE MUTATIONS IN CASES OF TYPE II MUCOLIPIDOSIS A/B IN THE CITIZENS OF BELARUS

Republican Scientific and Practical Centre “Mother and Child”
Minsk, 220053, the Republic of Belarus

Type II mucopolipidosis A/B is a rare autosomal-recessive disease caused by *GNPTAB* gene mutations. The work reports on novel and previously not described in the literature mutations c.1450_1451insT and c.1503_1521dup (NG_021243.1) in the 12th exon of the *GNPTAB* gene found in patients with type II mucopolipidosis A/B from Belarus.

Key words: type II mucopolipidosis A/B, *GNPTAB* gene mutations, neonatal mucopolipidosis II A/B.

Дата поступления статьи: 30 января 2019 г.

К.В. Жур¹, И.Б. Моссэ¹, А.В. Кильчевский¹, Л.В. Кухтинская¹, И.А. Чарыкова²

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ РЯДА ГЕНОВ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ С ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ СПОРТСМЕНОВ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: zhur_kv@mail.ru

²Республиканский научно-практический центр спорта
Республика Беларусь, 220007, г. Минск, ул. Воронянского, 50/1

Цель исследования заключалась в выявлении информативных молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с психоэмоциональным статусом человека. Проведено сравнение психофизиологических и генетических характеристик высококвалифицированных спортсменов и представителей популяционного контроля Беларуси. Генетическое тестирование проводили по ряду полиморфных вариантов генов нейромедиаторных систем. Для психофизиологического тестирования использовали аппаратно-программный комплекс «НС-ПсихоТест». Установлено, что различные полиморфные варианты генов ассоциированы с разными компонентами психической деятельности человека. Так, для носителей аллеля Т полиморфизма 939C/T гена *DRD2* и варианта C/C полиморфизма 521C/T гена *DRD4* характерна более высокая скорость протекания нервных и психических процессов в центральной нервной системе и большая общая подвижность нервных процессов по сравнению с носителями альтернативных вариантов. Кроме того, выявлено, что атлеты с аллельным вариантом 12/12 полиморфизма *STin2 VNTR* гена *SLC6A4* и с вариантом T/T полиморфизма T-182C гена *NET* отличаются эмоциональной нестабильностью. При сравнении частот аллелей полиморфных вариантов исследованных генов в группе спортсменов и в контрольной выборке статистически значимые различия были выявлены для полиморфизма 5-HTTLPR гена *SLC6A4*. Следовательно, полиморфные варианты *STin2 VNTR* и 5-HTTLPR гена *SLC6A4*, 939C/T гена *DRD2*, -521C/T *DRD4*, 833C/T гена *HTR2A* и T-182C гена *NET* являются информативными молекулярно-генетическими маркерами для оценки индивидуальных особенностей функционирования нервной системы спортсмена.

Ключевые слова: психоэмоциональный статус, нейромедиаторные системы, ДНК-полиморфизмы, спортивная успешность.

Введение

В последние десятилетия в мире наблюдается значительный интерес к генетической детерминации психоэмоционального статуса человека. Особенности психической деятельности человека обусловлены (предопределены) индивидуальными свойствами нервной системы и высшей нервной деятельности, человеческими инстинктами, темпераментом, с которыми человек рождается.

Согласно современным научным исследованиям, гены нейромедиаторных систем мозга играют значительную роль в формировании психологических свойств человека. Характер влияния генетического полиморфизма отдель-

ных генов, кодирующих различные ферменты и структурные белки, на состояние организма спортсменов, испытывающих физические и эмоциональные нагрузки, практически не изучен. Генетический «портрет» атлета позволяет учитывать его генетическую индивидуальность при разработке тренировочной программы и методов психологической коррекции и реабилитации, что способствует повышению результативности.

Согласно данным литературы, вклад наследственности в личностные характеристики человека составляет 30–60% [1, 2], что обуславливает интерес к поиску генетических маркеров, определяющих индивидуальные

психические особенности человека. Среди наиболее часто исследуемых полиморфных вариантов генов нейромедиаторных систем, ассоциированных с различными личностными характеристиками, являются полиморфизмы 939C/T гена *DRD2* и -521C/T гена *DRD4* дофаминергической системы, 833C/T гена *HTR2A*, *STin2 VNTR* и 5-HTTLPR гена *SLC6A4* серотонинергической системы и T-182C гена *NET* норэпинефринергической системы [3–9].

Цель исследования заключалась в выявлении наиболее информативных молекулярно-генетических маркеров, определяющих индивидуальные особенности протекания нервных и психических процессов человека на примере высококвалифицированных спортсменов, подвергающихся физическим и эмоциональным стрессам.

Материалы и методы

Проведение молекулярно-генетического тестирования спортсменов одобрено комитетом по этике государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр спорта».

Протестированы образцы ДНК представителей популяционного контроля ($n = 447$) и высококвалифицированных спортсменов — представителей олимпийских и национальных команд Беларуси ($n = 101$). В качестве биологического материала для исследования использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови с использованием коммерческого набора «ДНК-Экстрен» («Синтол», Россия). Генетическое тестирование полиморфных вариантов 939C/T гена *DRD2* (rs1800497), -521C/T *DRD4* (rs1800955), 833C/T гена *HTR2A* (rs6313) и T-182C гена *NET* (rs2242446) осуществляли с использованием наборов праймеров и зондов, разработанных компанией Applied Biosystems (C_7486676_10, C_7470700_30, C_3042197_1 и C_26354911_10 соответственно) согласно инструкции производителя. Тестирование полиморфизма *STin2 VNTR* гена *SLC6A4* выполняли методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зондов собственного дизайна. Анализ полиморфного варианта 5-HTTLPR гена *SLC6A4* проводили с применением описанной в литературе методики [10]. Для детекции флюоресценции, а также первичной обработки результатов применяли программное обеспе-

чение CFX96 Manager 3.1 (прибор CFX96, Bio-Rad, США) в автоматическом режиме.

Психофизиологическое тестирование спортсменов проводилось с использованием аппаратно-программного комплекса «НС-Психотест», разработанного ООО «Нейрософт» (Россия), включающего в себя множество разнообразных психологических и психофизических методик, большая часть которых связана с изучением сенсомоторных реакций (простая зрительно-моторная реакция, методики «Реакция различения», «Реакция на движущийся объект», «Помехоустойчивость», «Оценка внимания» и др.). В качестве базовой методики для выявления первичных параметров психоэмоционального состояния был выбран Восемьцветовой тест Люшера [11].

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 10.0 и SNPstats. Различия считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведен сравнительный анализ частот аллелей полиморфных вариантов 5-HTTLPR, *STin2 VNTR* гена *SLC6A4*, 939C/T гена *DRD2*, -521C/T *DRD4*, 833C/T гена *HTR2A* и T-182C гена *NET* в группе спортсменов и в контрольной выборке. Статистически значимые различия были выявлены при определении частот полиморфизма 5-HTTLPR гена *SLC6A4*: в группе атлетов частота встречаемости варианта S/S этого гена составила 29,4% по сравнению с 15,4% в группе популяционного контроля ($P = 0,03$). Результаты представлены в табл. 1.

Полиморфизм 5-HTTLPR гена *SLC6A4* представляет собой локус с варьирующимся числом tandemных повторов и определяет транскрипционную активность гена. Согласно данным литературы, носители аллеля S обладают большей нейрональной чувствительностью в ответ на позитивные, негативные и нейтральные стимулы и способны лучше регулировать свое состояние, целенаправленно фиксируя внимание на положительном стимуле [12]. В связи с тем, что вариант S/S преобладает в группе спортсменов, можно предположить, что он, вероятно, имеет преимущества в профессиональном спорте. Наши данные согласуются с результатами других авторов, которые выявили преобладание аллельного варианта S/S

Таблица 1

Сравнение частот аллельных вариантов полиморфизмов 5-HTTLPR, STin2 VNTR гена SLC6A4, 939C/T гена DRD2, -521C/T DRD4, 833C/T гена HTR2A и T-182C гена NET в группе спортсменов и популяционном контроле

Полиморфный вариант гена	Аллельный вариант	Частота встречаемости, %		χ^2	P
		Спортсмены	Контроль		
939C/T DRD2	C/C	55,20	61,50	4,40	0,11
	C/T	42,70	33,10		
	T/T	2,10	5,40		
-521C/T DRD4	C/C	19,10	25,30	1,86	0,39
	C/T	40,40	39,60		
	T/T	40,40	35,00		
STin2 VNTR SLC6A4	10/10	14,90	18,00	0,64	0,73
	10/12	46,80	43,40		
	12/12	38,30	38,50		
5-HTTLPR SLC6A4	L/L	41,20	40,70	7,28	0,03
	L/S	29,40	43,90		
	S/S	29,40	15,40		
833C/T HTR2A	C/C	38,50	38,70	0,00	1,00
	C/T	46,90	46,50		
	T/T	14,60	14,80		
T-182C NET	C/C	10,40	8,50	0,47	0,79
	C/T	42,70	41,80		
	T/T	46,90	49,70		

полиморфизма 5-HTTLPR гена SLC6A4 в группе девушек-спортсменок национальной сборной по академической гребле [13].

Для дальнейшего анализа мы делили спортсменов на две подгруппы согласно результатам психофизиологического тестирования, позволяющего оценить функциональное состояние атлетов. В частности, для определения общей подвижности нервных процессов использовали психофизиологический тест «Реакция различения», который характеризует стресс-устойчивость человека к изменяющимся условиям среды. Методика основана на регистрации скорости реакции испытуемого в

разных условиях. Хорошим показателем времени реакции считается значение менее 300 мс. Для группы исследуемых нами профессиональных спортсменов среднее значение времени реакции различения составило 288,9 мс, при этом минимальное и максимальное значения составили 209,7 мс и 378,8 мс соответственно.

Установлено, что для атлетов, которые демонстрировали время реакции менее 300 мс, частота встречаемости генотипа T/T полиморфизма 939C/T гена DRD2 была статистически значимо выше, чем в подгруппе спортсменов, которые затратили более 300 мс на выполнение теста (4,8% и 0% соответственно; P = 0,018).

При разделении всех испытуемых на группы в зависимости от аллельного варианта полиморфизма 939C/T гена *DRD2* установлено, что атлеты с вариантами C/T и T/T демонстрировали более низкие значения времени реакции различения по сравнению с носителями варианта C/C ($278,8 \pm 5,1$ мс и $296,8 \pm 4,5$ мс соответственно; $P = 0,008$). Наименьшее среднее значение времени реакции различения показали спортсмены с аллелем T в гомозиготном состоянии — $233,0 \pm 13,5$ мс.

Психофизиологический показатель «Время принятия решения» (ВПР) рассчитывается как разность между средним временем реакции различения и средним временем простой зрительно-моторной реакции и отражает скорость протекания нервных и психических процессов в центральной нервной системе, а именно — время переработки сигнала корковым отделом анализатора. Хорошим показателем считается значение не более 70 мс. Для группы исследуемых нами профессиональных спортсменов среднее значение ВПР составило 68,9 мс, минимальное и максимальное значения — 21,5 мс и 179,0 мс соответственно.

Установлено, что в группе атлетов, для которых ВПР ≤ 70 мс, частота встречаемости генотипа T/T полиморфизма 939C/T гена *DRD2* была значимо выше, чем в подгруппе спортсменов, которые показали время реакции на

выполнение теста более 70 мс (5,9% и 0% соответственно; $P = 0,034$).

При разделении всех испытуемых на группы в зависимости от аллельного варианта полиморфизма 939C/T гена *DRD2* установлено, что для атлетов с генотипами C/T и T/T время принятия решений составило $59,87 \pm 4,93$ мс (рис. 1), в то время как для носителей варианта C/C — $75,87 \pm 4,72$ мс ($P = 0,022$). Самым низким значением ВПР характеризовались спортсмены с генотипом T/T — $25,47 \pm 17,88$ мс.

Кроме того, нами были выявлены различия в распределении частот аллельных вариантов полиморфизма 521C/T гена *DRD4* в группах спортсменов с разными результатами теста «Оценка внимания». Хорошим показателем концентрации внимания является значение более 1 у. е. Средний результат по этому тесту для группы спортсменов составил 1,01 у. е., минимальное и максимальное значения — 0,84 у. е. и 1,3 у. е. соответственно. Согласно полученным нами результатам, частота встречаемости варианта C/C в подгруппе атлетов с показателем концентрации внимания более 1 у. е. была статистически ниже по сравнению с подгруппой спортсменов с аналогичным показателем менее 1 у. е. (10,4% и 26,4% соответственно; $P = 0,036$).

Аналогичные данные были получены при сравнении показателей концентрации внимания

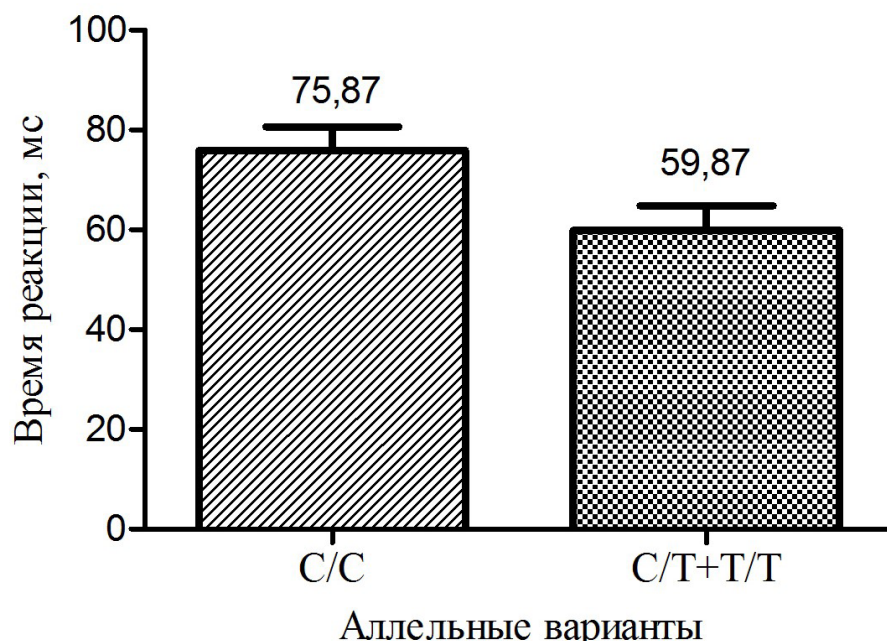


Рис. 1. Средние значения показателя «Время принятия решения» в группах спортсменов с различными аллельными вариантами полиморфизма 939C/T гена *DRD2*

у атлетов с различными аллельными вариантами полиморфизма *521C/T* гена *DRD4*. Выявлено, что носители аллеля С характеризовались более низкими показателями концентрации внимания ($P = 0,026$) по сравнению с носителями варианта *T/T* (рис. 2). В то же время носители вариантов *C/C* и *C/T* демонстрировали более высокую скорость выполнения теста «Реакция различения», т. е. тратили меньше времени на

выполнение теста по сравнению с атлетами с генотипом *T/T* ($P = 0,048$). Результаты представлены на рис. 3.

Таким образом, испытуемые с генотипом *C/C* гена *DRD4* демонстрируют значительно более низкие показатели концентрации внимания, но в то же время характеризуются меньшими значениями времени реакции различения, что соответствует более высокой скорости

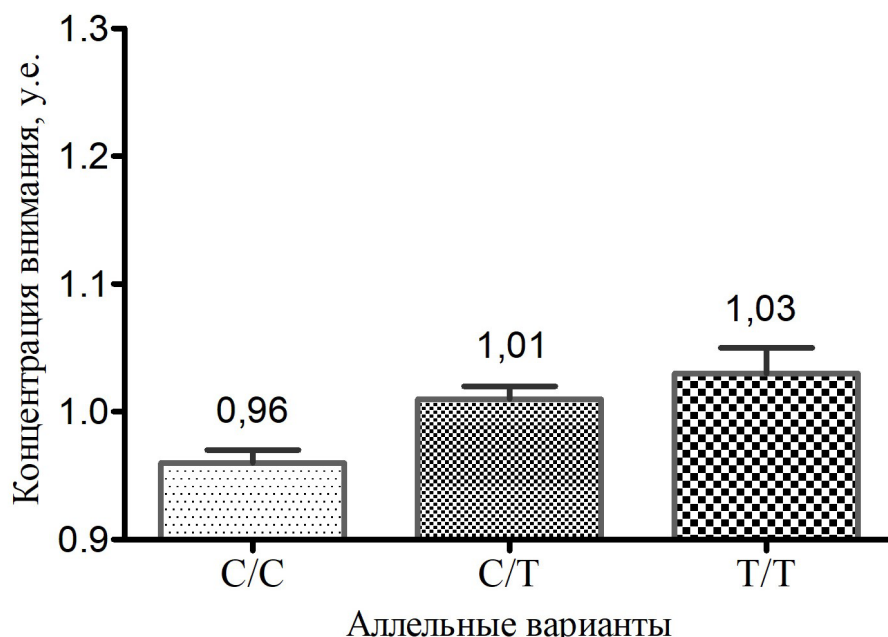


Рис. 2. Показатели концентрации внимания (Методика «Оценка внимания») в группах спортсменов с различными аллельными вариантами полиморфизма *-521C/T* гена *DRD4*

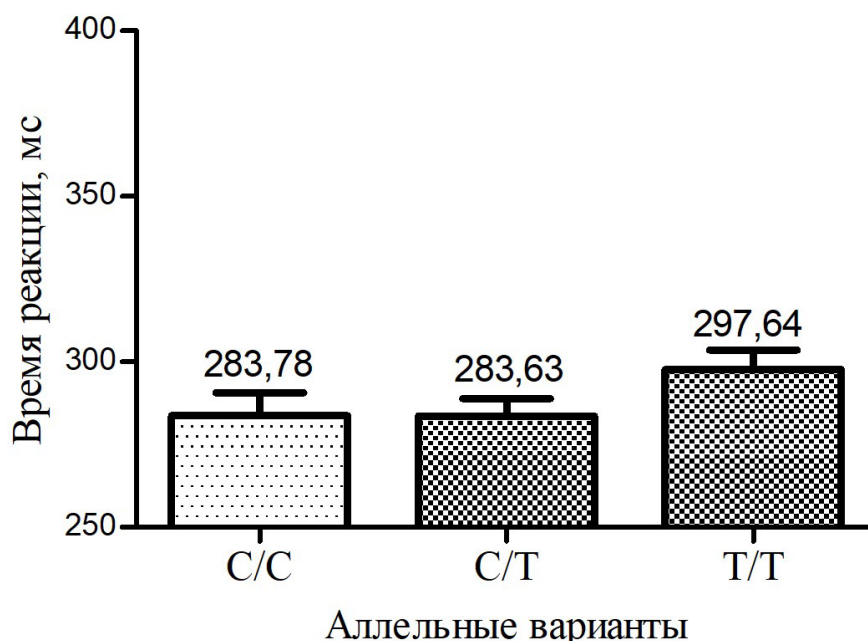


Рис. 3. Время реакции различения (Тест «Реакция различения») в группах спортсменов с различными аллельными вариантами полиморфизма *-521C/T* гена *DRD4*

протекания нервных и психических процессов в центральной нервной системе.

Для оценки уровня стресса использовали также Восьмицветовой тест Люшера — проективный метод, предназначенный для диагностики психического состояния человека. Результаты этого теста могут находиться в диапазоне от 0 до 41,8 баллов. Среднее значение уровня стресса для исследуемой нами группы спортсменов составило 5,16 баллов, минимальное и максимальное значения — 0 и 20,9 баллов соответственно. В группе спортсменов с более высокой степенью выраженности стресса (12 баллов и выше) частота встречаемости варианта 12/12 полиморфизма *STin2 VNTR* гена *SLC6A4* была значительно выше (61,5%) по сравнению с аналогичным показателем в группе спортсменов со значениями стресса менее 12 баллов (35,6%), тем не менее различия не достигли порога статистической значимости ($P = 0,078$).

При сравнении результатов психофизиологического тестирования у атлетов с различными аллельными вариантами полиморфизма *STin2 VNTR* гена *SLC6A4*, установлено, что носители варианта 12/12 характеризовались более высоким уровнем стресса по сравнению с носителями аллеля 10 (6,26 и 4,45 баллов соответственно; $P = 0,034$) и большим количеством совершенных ошибок в тесте «Реакция

различения» (3,23 и 2,40 баллов соответственно; $P = 0,032$), что свидетельствует о более низкой стрессоустойчивости носителей варианта 12/12 полиморфизма *STin2 VNTR* гена *SLC6A4*. Результаты представлены на рис. 4 и 5.

При сравнении результатов Восьмицветового теста Люшера у спортсменов с различными аллельными вариантами полиморфизма *T-182C* гена *NET* установлено, что носители варианта *T/T* характеризуются в среднем большими отклонениями от аутогенной нормы по сравнению с носителями аллеля *C* ($15,71 \pm 0,63$ и $13,85 \pm 0,61$ баллов соответственно; $P = 0,035$) (рис. 6). Чем меньше отклонение от нормы, тем ближе испытуемый к эталону нервно-психического благополучия. Значения отклонений от аутогенной нормы могут составлять от 0 до 32 баллов. Среди исследованных спортсменов встречались индивидуумы с минимальным и максимальным значениями 8 и 28 баллов соответственно.

В связи с тем, что мы исследовали элитных высококвалифицированных атлетов, в среднем группа характеризовалась хорошими психофизиологическими показателями, но в то же время для некоторых спортсменов психофизиологические показатели значительно отклонялись от принятой нормы. Отклонения от нормы среди высококвалифицированных спортсменов можно объяснить тем, что различные виды спорта

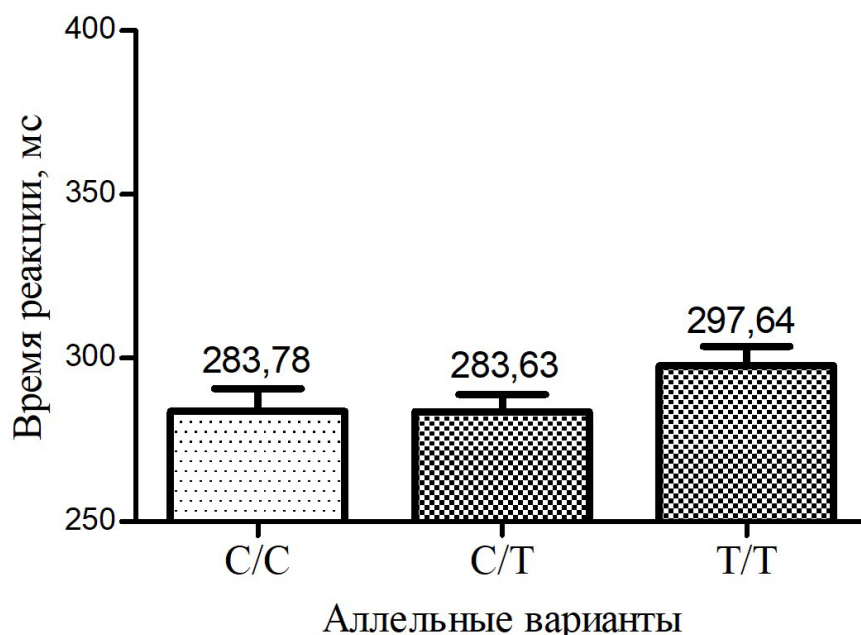


Рис. 4. Уровни стресса (Восьмицветовой тест Люшера) в группах спортсменов с различными аллельными вариантами полиморфизма *STin2 VNTR* гена *SLC6A4*

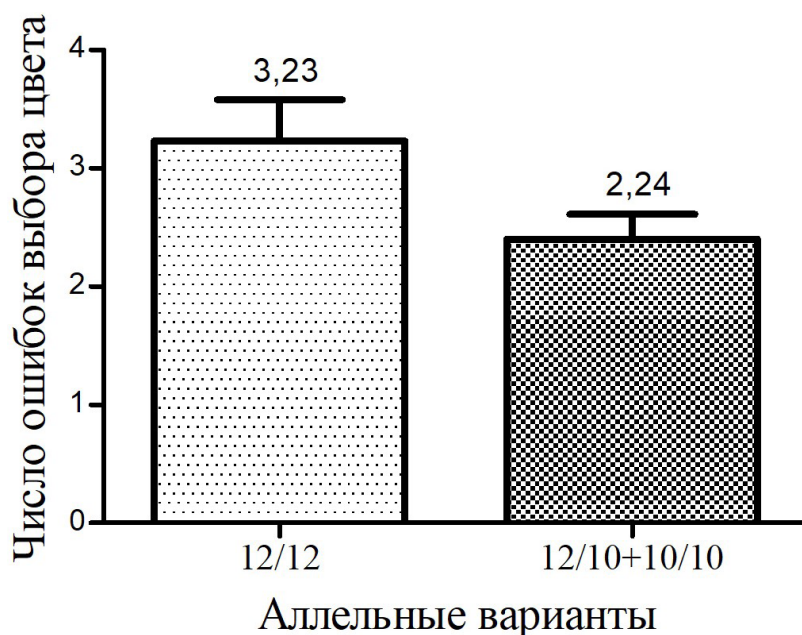


Рис. 5. Число ошибок при выполнении теста «Реакция различения» в группах спортсменов с различными аллельными вариантами полиморфизма *STin2 VNTR* гена *SLC6A4*

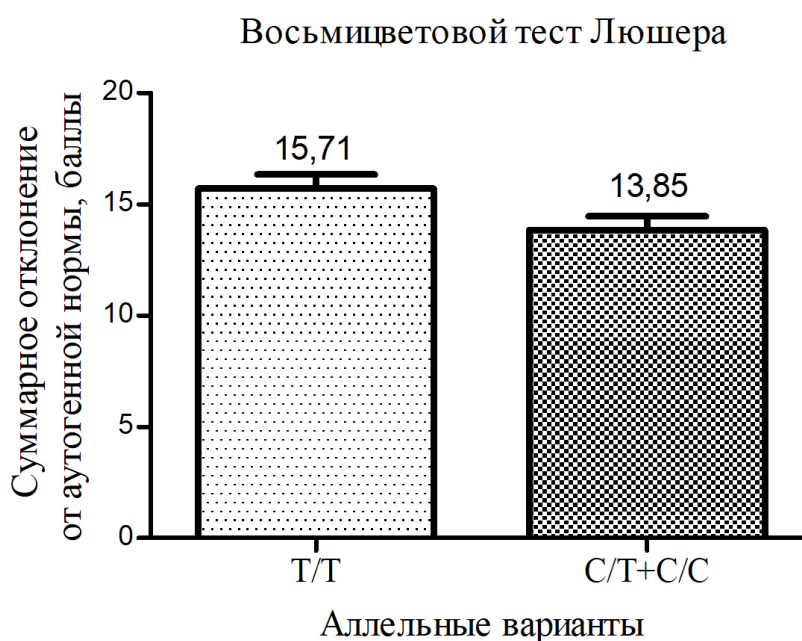


Рис. 6. Средние значения отклонений от аутогенной нормы (Восьмицветовой тест Люшера) в группах спортсменов с различными аллельными вариантами полиморфизма *T-182C* гена *NET*

предъявляют разные требования к психофизиологическим характеристикам спортсменов. Например, в одних спортивных специализациях требуется высокая концентрация, устойчивость и переключаемость внимания, в то время как в других большой объем внимания спортсменов не является необходимым или может быть даже вреден для достижения положительных результатов [14].

Заключение

Таким образом, в результате сравнения психофизиологических и генетических характеристик спортсменов показано, что различные аллельные варианты полиморфизмов *STin2 VNTR* и *5-HTTLPR* гена *SLC6A4*, *939C/T* гена *DRD2*, *-521C/T* *DRD4*, *833C/T* гена *HTR2A* и *T-182C* гена *NET* ассоциированы с разными компонентами психической деятельности человека.

В частности, установлено, что для носителей аллеля Т полиморфизма 939C/T гена *DRD2* и варианта С/С полиморфизма 521C/T гена *DRD4* характерна более высокая скорость протекания нервных и психических процессов в центральной нервной системе и более высокая общая подвижность нервных процессов, что определяет более высокую скорость восприятия и переработки информации по сравнению с носителями альтернативных вариантов.

В свою очередь, для спортсменов с вариантом 12/12 полиморфизма *STin2 VNTR* гена *SLC6A4* характерен более высокий уровень стресса, согласно Восьмицветовому тесту Люшера, и большее количество ошибок при выполнении теста «Реакция различения», что свидетельствует о более низкой стрессоустойчивости носителей данного аллельного варианта. Также более выраженная эмоциональная нестабильность характерна для атлетов с вариантом Т/Т полиморфизма Т-182С гена *NET*.

При сравнении частот аллелей полиморфных вариантов исследованных генов в группе спортсменов и в контрольной выборке статистически значимые различия были выявлены для полиморфизма 5-HTTLPR гена *SLC6A4*.

Следовательно, полиморфные варианты *STin2 VNTR* и 5-HTTLPR гена *SLC6A4*, 939C/T гена *DRD2*, -521C/T *DRD4*, 833C/T гена *HTR2A* и Т-182С гена *NET* являются информативными молекулярно-генетическими маркерами для оценки индивидуальных особенностей функционирования нервной системы спортсмена.

Список использованных источников

1. Stein, M.B., Jang, K.L., Livesley, W.J. Heritability of anxiety sensitivity: a twin study // *Am J Psychiatry*. — 1999. — Vol. 156, № 2. — P. 246–251.
2. Stein, M.B., Jang, K.L., Livesley, W.J. Heritability of social anxiety-related concerns and personality characteristics: a twin study // *J Nerv Ment Dis*. — 2002. — Vol. 190, № 4. — P. 219–224.
3. Elovainio, M., Jokela, M., Kivimäki, M., Pulkki-Raback, L., Lehtimäki, T., Airta, N., Keltikangas-Järvinen, L. Genetic variants in the *DRD2* gene moderate the relationship between stressful life events and depressive symptoms in adults: cardiovascular risk in young Finns study // *Psychosom Med*. — 2007. — Vol. 69, № 5. — P. 391–395.
4. Gonda, X., Fountoulakis, K.N., Harro, J., Pompili, M., Akiskal, H.S., Bagdy, G., Rihmer, Z. The possible contributory role of the S allele of 5-HTTLPR in the emergence of suicidality // *J Psychopharmacol*. — 2011. — Vol. 25, № 7. — P. 857–866.
5. Munafo, M.R., Yalcin, B., Willis-Owen, S.A., Flint, J. Association of the dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene and approach-related personality traits: meta-analysis and new data // *Biol Psychiatry*. — 2008. — Vol. 63, № 2. — P. 197–206.
6. Ni, X., Bismil, R., Chan, K., Sicard, T., Bulgin, N., McMain, S., Kennedy, J.L. Serotonin 2A receptor gene is associated with personality traits, but not to disorder, in patients with borderline personality disorder // *Neurosci Lett*. — 2006. — Vol. 408, № 3. — P. 214–219.
7. Serretti, A., Calati, R., Mandelli, L., De Ronchi, D. Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review // *Curr Drug Targets*. — 2006. — Vol. 7, № 12. — P. 1659–1669.
8. Sun, N., Xu, Y., Wang, Y., Duan, H., Wang, S., Ren, Y., Peng, J., Du, Q., Shen, Y., Xu, Q., Zhang, K. The combined effect of norepinephrine transporter gene and negative life events in major depression of Chinese Han population // *J Neural Transm (Vienna)*. — 2008. — Vol. 115, № 12. — P. 1681–1686.
9. Varga, G., Szekely, A., Antal, P., Sarkozy, P., Nemoda, Z., Demetrovics, Z., Sasvari-Szekely, M. Additive effects of serotonergic and dopaminergic polymorphisms on trait impulsivity // *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. — 2012. — Vol. 159B, № 3. — P. 281–288.
10. Гуреев, А.С., Ким, А.А., Санина, Е.Д., Ширманов, В.И., Кошечкин, В.А., Балановский, О.П., Янковский, Н.К., Боринская, С.А. Распределение частот VNTR аллелей локуса 5-HTTLPR гена транспортера серотонина в населении Евразии и Африки. // *Экологическая генетика*. — 2014. — Т. 12, № 3. — С. 71–86.
11. Ильин, Е.П. Психофизиология состояний человека. — 2005. — 412.
12. Canli, T., Omura, K., Haas, B.W., Fallgatter, A., Constable, R.T., Lesch, K.P. Beyond affect: a role for genetic variation of the serotonin transporter in neural activation during a cognitive attention task // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2005. — Vol. 102, № 34. — P. 12224–12229.
13. Маринич, В.В., Кардаш, А.В. Оценка эффективности применения психофизиологи-

ческой диагностики в спорте высших достижений // Здоровьесберегающие технологии и системы: психолого-педагогические и медико-биологические аспекты: материалы II Международной научно-практической конференции. (Барановичи, 20 мая 2016 г.). — Беларусь, 2016. — С. 39–42.

14. Щедрин, Д.С., Анализ особенностей внимания у спортсменов в разных видах спорта [Электронный ресурс] // Электронный справочник «Информо». — Режим доступа: <http://www.informio.ru/publications/id1873/Analiz-osobennostei-vnimaniya-u-sportsmenov-v-raznyh-vidah-sporta>. — Дата доступа: 31.01.2019.

K.V. Zhur¹, I.B. Mosse¹, A.V. Kilchevsky¹, L.V. Kukhtinskaya¹, I.A. Charykova²

ASSOCIATIONS OF POLYMORPHIC VARIANTS OF A NUMBER OF NEUROTRANSMITTER SYSTEM GENES WITH ATHLETE PSYCHOPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS

¹Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

²Republican Scientific and Practical Sports Centre
Minsk, 220007, the Republic of Belarus

The aim of the study was to identify informative molecular genetic markers associated with the psycho-emotional status of a person. A comparison of the psychophysiological and genetic characteristics of highly skilled athletes and representatives of the population group of Belarus was made. Genetic testing was performed by a number of polymorphic variants of neurotransmitter system genes. A hardware and software complex “NS-PsychoTest” was used for psychophysiological testing. It has been established that various polymorphic variants of genes are associated with different components of human mental activity. Thus, carriers of the T allele of the 939C/T polymorphism of the *DRD2* gene and the C/C variant of the 521C/T polymorphism of the *DRD4* gene are characterized by a higher rate of nervous and mental processes in the central nervous system and a higher overall mobility of the nervous processes compared with carriers of alternative variants. In addition, athletes with the allelic variant 12/12 of the *STin2 VNTR* polymorphism of the *SLC6A4* gene and the of the *T-182C* polymorphism of the *NET* gene are notable for emotional instability. When comparing the frequencies of alleles of polymorphic variants of the studied genes in the group of athletes and the control group, statistically significant differences were found for the 5-HTTLPR polymorphism of the *SLC6A4* gene. Consequently, the polymorphic variants *STin2 VNTR* and 5-HTTLPR of the *SLC6A4* gene, 939C/T of the *DRD2* gene, -521C/T of the *DRD4* gene, 833C/T of the *HTR2A* gene and *T-182C* of the *NET* gene are informative molecular-genetic markers for assessing the individual features of human nervous system performance.

Keywords: psycho-emotional status, neurotransmitter systems, DNA polymorphisms, athletic performance.

Дата поступления статьи: 6 февраля 2019 г.

Е.П. Михаленко, А.Н. Щаюк, А.В. Кильчевский

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ: МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ВЫЖИВАЕМОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК (Обзорная статья)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: E.Michalenko@igc.by

В обзоре представлены данные современной литературы об основных структурных компонентах внутриклеточных сигнальных путей: ауто/паракринных факторах роста, их тирозинкиназных рецепторах и нижележащих сигнальных белках. Подробно описаны основные клеточные сигнальные пути (PI3K/Akt/mTOR и RAS/RAF/MAPK) и молекулярно-генетические нарушения ключевых компонентов этих путей, приводящие к развитию онкологических заболеваний. Анализ литературы показал, что один из главных механизмов канцерогенеза — постоянная активации сигнального пути, которая обеспечивается различными молекулярными механизмами: мутациями и амплификацией генов, повышенной активностью транскрипции основных компонентов сигнального каскада.

Ключевые слова: PI3K/Akt/mTOR сигнальный путь, RAS/RAF/MAPK сигнальный путь, опухолевые клетки, факторы роста, мутации.

Введение

Возникновение злокачественной опухоли — многостадийный процесс. Сначала происходит первичный контакт канцерогенного или другого повреждающего агента с эпителием, его активация и взаимодействие с ДНК эпителиальной клетки, что приводит к изменению ее генома и фенотипа — образуется модифицированная клетка с новыми свойствами, которая может дать начало опухолевому клону. Для возникновения и развития онкопатологических процессов у человека, необходимо возникновение более 5-9 мутаций [1-4].

Дальнейшее развитие и прогрессирование злокачественной опухоли происходит в виде ее экспоненциального роста и метастазирования, которое можно описать как опухолевая прогрессия. Активные исследования механизмов злокачественной трансформации и прогрессии привели к идентификации ряда сигнальных путей, ответственных за регуляцию пролиферации и выживаемости опухолевых клеток.

Детальное понимание регуляции многоступенчатого процесса формирования злокачественной опухоли поможет разработать эффективные подходы к лекарственной терапии.

1. Факторы роста и их рецепторы как инициаторы сигнальных путей

1.1. Молекулярные механизмы передачи митогенного сигнала

В конце 70-х годов XX века M.B. Sporn и G.J. Todaro определили, что в патогенезе и прогрессии многих злокачественных опухолей важную роль играют механизмы паракринной и аутокринной регуляции клеточного деления [5]. Паракринная регуляция заключается в том, что секретируемые клетками активные вещества распространяются за счет диффузии и действуют на соседние клетки-мишени. Так функционируют, например, митогенные стимуляторы (полипептидные ростовые факторы) — эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующий фактор роста (TGF) и др. [6]. При аутокринной регуляции одна и та же клетка является источником ростового фактора и его мишенью. В результате может возникать непрекращающаяся, самоподдерживающаяся митогенная активация клетки, приводящая к нерегулируемому размножению. Клетка не нуждается во внешних митогенных стимулах и становится полностью автономной.

Перенос митогенного сигнала от периферии клетки к ее ядру осуществляется в виде каскада реакций фосфорилирования посредством протеинкиназ — ферментов, фосфорилирующих белки. Существует три типа протеинкиназ (тирозиновые, сериновые и треониновые), разделенных по их способности фосфорилировать определенные аминокислоты [6, 7]. Фосфатные группы играют роль молекулярных переключателей: меняя конформацию определенных доменов, они могут «включать» или «выключать» их активность (ферментативная активность, ДНК-связывающая способность и способность образовывать белок-белковые комплексы). Митогенный сигнал в клетке заключается в передаче фосфатной группы от одной протеинкиназы к другой. В конечном итоге она достигает ядерных регуляторных белков, активирует их посредством фосфорилирования и индуцирует транскрипцию генов, регулирующих процессы роста в нормальных и опухолевых клетках. Активность протеинкиназ практически на любом этапе переноса митогенного сигнала уравнивается активностью противодействующих им ферментов — дефосфорилирующих белки фосфатаз. Баланс позитивных и негативных эффектов — фундаментальное свойство регуляции клеточного деления, проявляемое на любом его уровне [6].

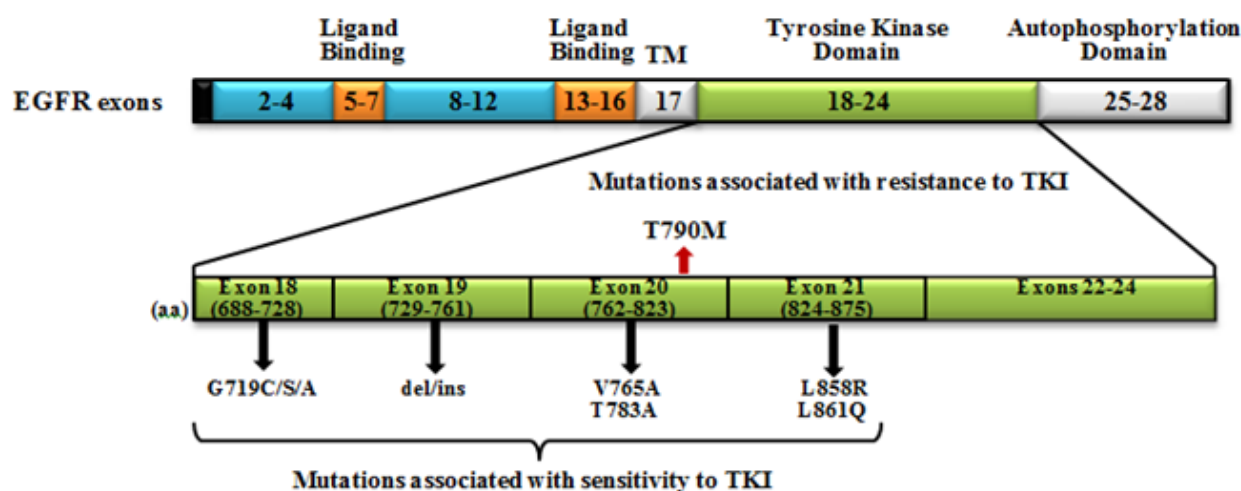
Опухолевый рост является следствием нарушения тканевого гомеостаза, поддерживаемого балансом клеточной пролиферации и апоптоза. Нормальные клетки, в отличие от опухолевых, ограничены целым рядом барьеров и могут пролиферировать только при наличии определенных условий, включая наличие факторов роста и отсутствия «антиростовых» сигналов. Факторы роста чаще всего представлены небольшими белками или стероидными гормонами, поступающими из внеклеточного пространства и распознаваемыми специфическими рецепторами. Чувствительность клетки к определенным факторам роста определяется наличием соответствующих рецепторов на мембране клетки или внутри нее. Мембранные рецепторы, как правило, относятся к классу рецепторных тирозинкиназ (РТК) и связывание ими лиганда ведет к фосфорилированию определенных участков на самих молекулах либо на других белках [3–7].

1.2. Рецептор эпидермального фактора роста

Одним из основных трансмембранных тирозинкиназных рецепторов, регулирующих процессы клеточного роста и дифференцировки, является рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). Экспрессия гена EGFR физиологически необходима как для нормальных, так и трансформированных эпителиальных клеток [8]. Этот рецептор относится к семейству ErbB белков, которое включает тирозинкиназные рецепторы: ErbB2 (HER2/c-neu), ErbB3 (HER3) and ErbB4 (HER4). Зрелый белок EGFR с молекулярной массой 170 kDa имеет типичное для РТК строение: экстрацеллюлярный домен, разделенный на четыре поддомена (I, II, III, IV), которые связывают лиганд, трансмембранный домен и внутриклеточный участок, состоящий из тирозинкиназного домена и С-концевого домена [9].

Кроме основного лиганда — эпидермального фактора роста (EGF) — лигандами для EGFR могут быть: трансформирующий фактор роста альфа, амфирегулин, бетацеллюлин, эпирегулин, гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста. Все лиганды EGFR имеют между собой примерно 40% гомологию по первичной структуре и сходны по пространственному строению благодаря наличию консервативных последовательностей. Связывание лиганда с EGFR приводит к его гомо- или гетеродимеризации с перекрестным фосфорилированием специфических остатков тирозина в тирозинкиназном домене. Далее сигнал передается на 2 основных внутриклеточных сигнальных каскада, ответственных за пролиферацию и выживаемость клеток — RAS/RAF/MAPK and PI3K/Akt/mTOR сигнальные пути [10, 11]. Нормальное функционирование рецептора EGFR включает в себя точное сочетание взаимосвязанных компонентов: фактор роста, рецептор и последующие участники сигнального пути. Мутации в гене *EGFR* приводят к тому, что рецептор активируется, не взаимодействуя с фактором роста, автономно передавая сигнал фосфорилирования на внутриклеточные сигнальные каскады.

Ген EGFR расположен на 7 хромосоме в области 7p11.2, имеет длину 237599 п. о. и содержит 28 экзонов (рис. 1): 5–7 и 13–16 экзоны гена EGFR кодируют лиганд-связывающие

Рис. 1. Структура гена *EGFR* [13]

домены рецептора *EGFR*, 17-й экзон — ответственный за образование трансмембранного домена. Клиническое значение имеют 18–24 экзоны, так они кодируют тирозинкиназный домен рецептора [12, 13]. Наиболее часто встречаются мутации в экзонах, кодирующих тирозинкиназный домен рецептора: микроделеции в 19-м экзоне (44%) и мутация в 21-м экзоне, приводящая к замене лейцина на аргинин в 858 положении (41%) [14]. Данные мутации ассоциированы с такими онкологическими заболеваниями, как рак легкого [9, 11, 14], рак прямой кишки [15], глиобластома [16].

Соматические мутации гена *EGFR* являются молекулярным маркером чувствительности опухоли к лечению таргетными препаратами, направленными на ингибирование тирозинкиназ. С одной стороны, наличие таких мутаций может являться одним из ключевых механизмов опухолевой прогрессии, так как приводит к избыточной активности мутантного рецептора после его связывания с лигандом, а с другой — может способствовать эффективному и более длительному связыванию лекарственных препаратов. Поэтому в данном случае такие тирозинкиназные ингибиторы, как гефитиниб и эрлотиниб, в большей степени блокируют активность мутантного рецептора, чем немутированного *EGFR*. Их эффект направлен на инактивацию рецептора с целью блокирования механизмов передачи ростового сигнала в опухоли, подавления пролиферации, дифференцировки и ангиогенеза [16, 17]. Следовательно, выявление пациентов с такими мутациями позволит корректировать

эффективность лечения у конкретного пациента и максимально индивидуализировать терапевтический подход к лечению.

2. Основные сигнальные пути опухолевых клеток

Выживаемость опухолевой клетки обеспечивается активацией нескольких альтернативных сигнальных механизмов. При этом активация компонентов различных сигнальных путей приводит к развитию опухолей различной локализации.

Некоторые сигнальные пути опухолевых клеток представлены в табл. 1.

Внутриклеточные сигнальные каскады PI3K/Akt/mTOR и RAS/RAF/MAPK относятся к основным путям, задействованным в регуляции пролиферации, роста, дифференцировки, выживаемости, апоптоза клеток и активации ангиогенеза.

Активация этих сигнальных путей может осуществляться несколькими механизмами:

- 1) через факторы роста EGF, VEGF и TGFβ1 при присоединении их к рецепторам *EGFR*, *VEGFR* и *TGFR*;
- 2) за счет активации рецептора при его молекулярно-генетических нарушениях без присоединения к нему фактора роста;
- 3) при молекулярно-генетических изменениях и, как следствие, гиперактивации первых компонентов данных сигнальных путей (RAS и PI3K), в результате чего нет необходимости принимать активирующий сигнал от рецепторов, так как сигнальный путь находится в постоянно активном состоянии [6, 7].

Таблица 1

Внутриклеточные сигнальные пути опухолевых клеток

Сигнальный путь	Онкопротеин	Белки опухолевой супрессии	Влияние сигнального пути	Опухоли, возникающие при дефектах пути
RAS/RAF/MAPK	KRas, B-Raf	Нейрофибромин	Пролиферация, дифференцировка	Солидные опухоли
PI3K/Akt/mTOR	PI3K, AKT	Гамартин, туберин, PTEN, FOXO	Пролиферация, сдерживание апоптоза	Солидные опухоли
WNT	Wnt, β -катенин	APC, аксин	Пролиферация, дифференцировка, регуляция стволовых клеток	Рак прямой кишки
P53/Rb	Mdm2	Rb, p53, ATM	Пролиферация, апоптоз, геномная стабильность	Солидные опухоли
TGF- β /SMAD	SMAD6, SMAD7	TGFR, SMAD2, SMAD4,	Пролиферация	Лейкемия
JAK/STAT	STAT3, STAT5	STAT1, SOCS1	Пролиферация	Лейкемия
Hedgehog	SMO, SHH	SUFU, Ptch	Пролиферация, дифференцировка	Базалиома, рак бронхов, медуллобластома
Notch	Notch 1		Пролиферация, дифференцировка	Рак молочной железы, лимфома, Т-клеточная лейкемия, рак поджелудочной железы
NF/ κ B	C-Rel	CYLD	Пролиферация, апоптоз	Лимфома

Кроме того, оба сигнальных каскада могут взаимодействовать друг с другом через общие компоненты по принципу положительных и отрицательных обратных связей. В клетке формируется сеть, в которой RAS/RAF/MAPK и PI3K/AKT/mTOR каскады могут сообщаться через промежуточные звенья (рис 2).

2.1. RAS/RAF/MAPK сигнальный путь

RAS/RAF/MAPK-киназный сигнальный путь представляет собой цепь последовательно взаимодействующих белков, которые передают сигнал от рецептора с поверхности клетки внутрь ядра. В результате передачи сигнала контролируется транскрипция генов, метаболизм, пролиферация и подвижность, апоптоз клеток и ангиогенез.

Ключевым компонентом MAP-киназного сигнального пути является белок KRas. У человека семейство Ras-белков включает три белка: KRas, NRas и HRas. Фиксированные на внутренней стороне клеточной мембраны,

белки Ras являются первыми членами каскада киназ, который приводит к активации сигнальных путей и транскрипции генов, регулирующих дифференцировку и пролиферацию клеток (рис.2) [18]. Ras представляет собой малую гуанозинтрифосфатазу (ГТФазу), которая присутствует во всех клетках организма. Белок состоит из 6 β -цепей и 5 α -спиралей, имеет G-домен, содержащий 166 аминокислотных остатков и непосредственно участвующий в связывании ГТФ и ГДФ. Ras-белки могут существовать в двух формах: неактивной и активной. Ras-белок действует как «молекулярный переключатель» сигнального каскада, переходя из активной формы в неактивную путем гидролиза ГТФ.

В нормальных клетках большинство молекул Ras находятся в неактивном ГТФ-связанном состоянии, они кратковременно активируются в ответ на внеклеточный сигнал факторов роста. Активация Ras регулируется рецепторной тирозинкиназой EGFR. После связывания

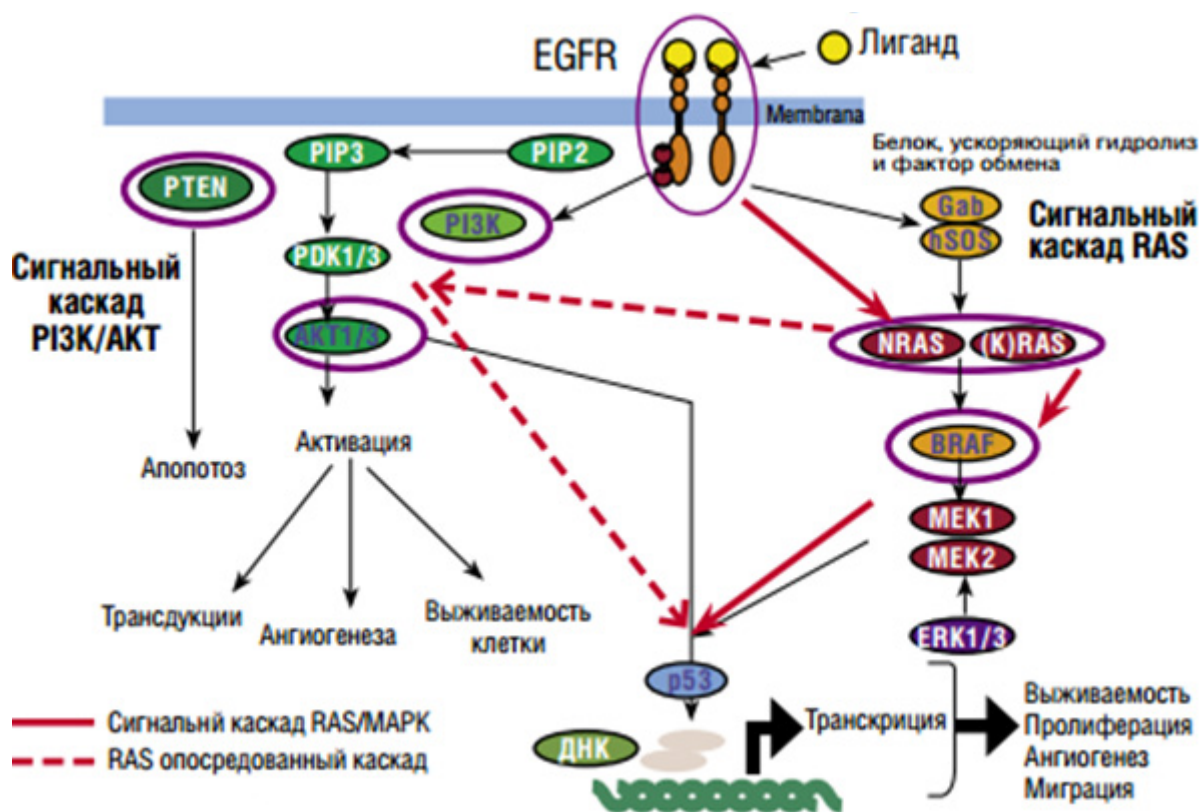


Рис.2. Структура и схема взаимодействия тирозинкиназных каскадов RAS/RAF/MAPK и PI3K/Akt/mTOR

рецепторной внеклеточной части тирозинкиназы с фактором роста и ее димеризации происходит перекрестное фосфорилирование ее внутриклеточных тирозинкиназных доменов. Фосфорилирование приводит к образованию активной конформации киназы и формируется комплекс Ras-ГТФ. После гидролитического превращения ГТФ в ГДФ Ras снова инактивируется — сигнал прерывается. В процессе гидролиза участвуют остатки аминокислот в 12, 13 и 61 положении белка Ras.

Ген *KRAS* расположен на 12 хромосоме в области 12p12.1-p11.1, имеет общую протяженность 38 kb и состоит из 4 экзонов. В большинстве случаев мутации в гене *KRAS* являются миссенс-мутациями, вносящими аминокислотную замену в положении 10, 12, 13, или 61. Если в гене *KRAS* происходят мутации, которые приводят к аминокислотной замене, то скорость гидролиза ГТФ снижается. В результате происходит конститутивная активация *KRAS*-зависимых сигнальных путей. В отличие от нормальных клеток, мутации возникают во многих опухолевых клетках, и RAS-зависимый сигнальный каскад остается активным на протяжении длительного времени [18, 19].

Большинство всех молекулярно-генетических нарушений представлены точечными заменами одного нуклеотида в последовательности второго экзона гена *KRAS*, которая кодирует 12 и 13 аминокислоты. В норме в обеих позициях располагается глицин — единственная аминокислота, которая не содержит боковую цепь. Любое изменение этой последовательности приводит к замене глицина на разветвленные аминокислоты, что вызывает нарушение пространственной структуры белка. В результате этого блокируется способность специальных ферментов инактивировать комплекс Ras с ГТФ путем гидролиза энергетической молекулы. Сигнал начинает поступать от активированного Ras к низлежащим компонентам каскада независимо от статуса EGFR [19].

Наиболее часто мутации гена *KRAS* выявляются при раке поджелудочной железы (52–75%) и колоректальном раке (31–37%) [20, 21]. При раке легкого мутации в гене *KRAS*, в отличие от мутаций в гене *EGFR*, чаще встречаются у курильщиков. Ассоциированные с опухолью *KRAS* мутации встречаются приблизительно у 15–25% пациентов с аденокарциномой легкого и являются редко-

стью для пациентов с плоскоклеточным раком легкого [22, 23]. Имеются данные, что мутации в гене *KRAS* ассоциированы со снижением выживаемости пациентов с онкопатологиями, а также неэффективностью терапии тирозинкиназными ингибиторами [24, 25]. Распределение частоты встречаемости мутаций гена *KRAS* также отличается в разных популяционных группах и зависит от этнических характеристик: чаще встречаются у европеоидов, чем у азиатов [26, 27].

К запуску классического RAS/RAF/MAPK пути приводит также активация серин-/треонинкиназы BRAF. Решающим моментом для активации BRAF является не связывание на Ras-ГТФ, а перемещение на внутреннюю поверхность плазматической мембраны. Соматические активирующие мутации гена *BRAF* часто встречаются при меланоме кожи, опухолях щитовидной железы, раке яичников, раке толстой и прямой кишки. Наиболее частой активирующей мутацией гена *BRAF* является точечная нуклеотидная замена с.1799T>A, которая соответствует мутации V600E в белке BRAF. При меланоме кожи мутация V600E составляет 80–90% мутаций гена *BRAF* [28].

В ряде работ показано, что для некоторых клеточных процессов, приводящих к трансформации клеток, важна Ras-зависимая активация PI3K/Akt/mTOR сигнального каскада [29].

2.2. PI3K/Akt/mTOR-сигнальный путь

Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR — это внутриклеточный киназный каскад, центральными компонентами которого являются фосфоинозитол-3-киназа (PI3K), киназы Akt и mTOR. Данный сигнальный каскад вместе с RAS/RAF/MAPK относится к основным путям, задействованным в регуляции пролиферации, роста, дифференцировки, выживаемости, апоптоза клеток и активации ангиогенеза. Этот путь обеспечивает в клетках быструю подготовку аппарата синтеза белка в ответ на пролиферативный стимул [30]. Активность PI3K/Akt/mTOR в нормальных тканях невысокая. Активация этого сигнального пути отмечается во многих злокачественных опухолях, характеризующиеся агрессивным течением и устойчивостью к химио- и лучевой терапии и неблагоприятным прогнозом течения заболевания [31, 32].

2.2.1. Характеристика фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Фосфоинозитид-3-киназы, или фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3Ks) — семейство ферментов, фосфорилирующих 3-гидроксильную группу инозитольного кольца фосфатидилинозитола. PI3Ks принимают сигнал фосфорилирования от тирозинкиназных рецепторов и передают его далее на первичную эффекторную молекулу сигнального каскада PI3K — протеинкиназу B (Akt).

Существует три класса PI3K, каждый с определенной субстратной специфичностью: I, II и III [33–35]. У млекопитающих класс I PI3K является наиболее изученным и определяется во всех типах клеток. Первый класс разделяется на подклассы IA и IB в зависимости от типа рецепторов, которыми они активируются. Члены этих подклассов имеют различные регуляторные субъединицы и изоформы. Фосфатидилинозитол-3-киназы подкласса IA активируются тирозинкиназными рецепторами факторов роста. PI3K IA представляет собой гетеродимерный белок с регуляторной субъединицей 85 кДа и каталитической субъединицей 110 кДа [36, 37]. На сегодняшний день доказано, что PI3Ks подкласса IA наиболее широко вовлечены в патогенез онкологических заболеваний [30, 36, 38]. PI3-киназы подкласса IB активируются рецепторами, связанными с G-белком. Роль их в онкогенезе пока неизвестна [39].

2.2.2. Механизм регуляции PI3K-Akt-mTOR каскада. Активация PI3K/AKT/mTOR происходит непосредственно тогда, когда факторы роста EGF и VEGF связываются со своими тирозинкиназными рецепторами EGFR и VEGFR или путем передачи сигнала от активированного Ras-белка (рис. 3). Это приводит к присоединению PI3K IA к цитоплазматической мембране, где данная киназа преобразует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP2) в фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3). PIP3 играет роль вторичного мессенджера и связывается с протеинкиназой B (Akt). Akt фосфорилируется фосфоинозитид-зависимой киназой 1 (PDK1) в каталитическом домене по остатку триптофана в 308 положении и комплексом mTORC2 в C-доме по остатку серина в 473 положении. В результате данных процессов происходит полная активация Akt. Akt фосфорилирует и инактивирует

комплекс TSC2-TSC1, что приводит к накоплению в клетке белка RHEB. Данный белок является гомологом Ras-белков и обладает ГТФ-азной активностью. Путем гидролиза ГТФ белок RHEB активирует передачу сигнала через mTOR — серин/треонин киназу, активирующую факторы транскрипции, что приводит к контролю клеточного роста и деления [30, 33, 40–44].

Ключевым компонентом процесса деактивации PI3K/AKT/mTOR является опухолевый супрессор PTEN, который функционирует, как фосфатаза с двойной субстратной специфичностью [45, 46]. PTEN преимущественно дефосфорилирует фосфоинозитидные субстраты, снижает внутриклеточный уровень PIP3 — отщепляет фосфат от PIP3, превращая его в PIP2 (рис. 3). В нормальных клетках

уровень PIP3 очень низок, он увеличивается при усилении активности ростовых факторов. Инактивация PTEN приводит к повышению уровня PIP3, что имитирует стимуляцию ростовыми факторами. PIP3 индуцирует продвижение клетки по клеточному циклу, усиливает выживаемость и увеличивает размер клетки. Гиперэкспрессия гена PTEN приводит к аресту клеточного цикла, индукции апоптоза и маленькому размеру клеток. PTEN подвергается пост-трансляционным модификациям, которые изменяют уровень фосфатазной активности, влияют на встраивание PTEN в молекулярные комплексы, на локализацию в клетке и на стабильность белка [36, 47, 48]. Эти модификации имеют значение при патогенезе рака: полная генетическая инактивация PTEN наблюдается при глиобластоме, карциноме эн-

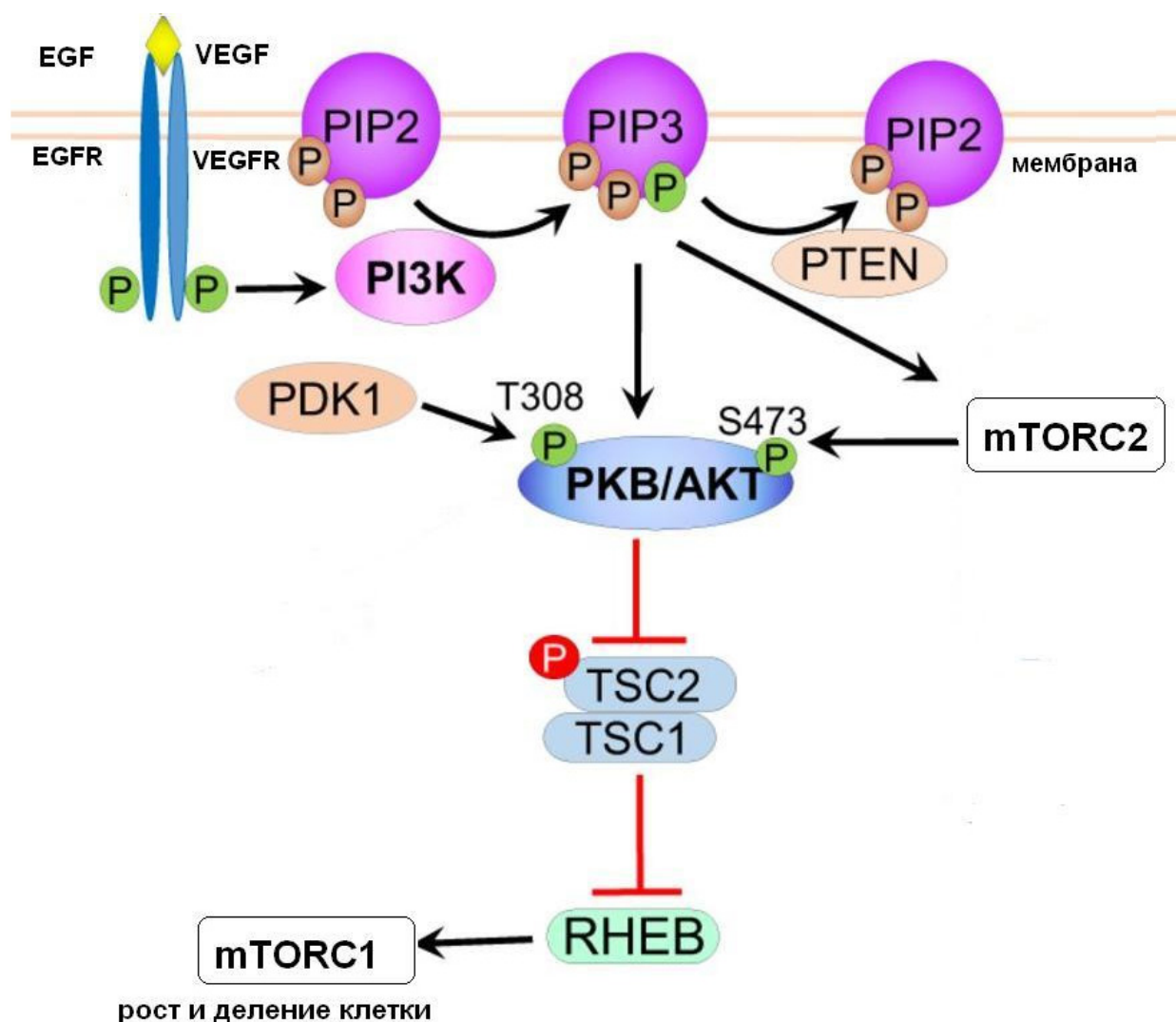


Рис.3. Механизм регуляции PI3K-Akt-mTOR каскада [30]

дометрия, раке простаты [49–52], а неполная инактивация *PTEN* отмечается при раке легких, раке молочной железы [53–56].

Активность *PI3K/Akt/mTOR* тонко регулируется в нормальных тканях, но данный каскад может быть постоянно активен в более чем 50% раковых опухолей. Среди белков, мутации или изменение активности которых приводят к активации *PI3K/Akt/mTOR*-сигнального пути, основное место принадлежит *PI3K* и *PTEN* [57–59].

Соматические мутации в гене *PIK3CA*, кодирующем каталитическую субъединицу *p110α* *PI3K*, играют значительную роль в патогенезе и прогрессии опухолей.

Ген *PIK3CA* расположен на 3 хромосоме в области 3q26.32 и содержит 23 экзона. Несинонимичные однонуклеотидные замены составляют 98% соматических мутаций, найденных в этом гене. Более 90% всех мутаций встречаются в 9 и 20 экзонах: *p.E542K* (*c.1624G>A*), *p.E545K* (*c.1633G>A*), *p.H1047R* (*c.3140A>G*) и *p.H1047L* (*c.3140A>T*) [28]. Показано, что эти мутации являются онкогенными, поскольку повышают киназную активность *PI3K* и ведут к активации нижеописанной киназы *Akt* [60–62]. Данные мутации часто встречаются при раке молочной железы (8,3–40%), колоректальном раке (18,8–32%), раке эндометрия, мочевого пузыря, желудка [63–70] и раке легкого, хотя роль мутаций в этом случае остается не до конца ясной, так как только некоторые исследования показывают ассоциацию мутаций гена *PIK3CA* с развитием опухолей легкого [29, 71–73].

Антагонист *PI3K* белок *PTEN* кодируется геном *PTEN*. Ген *PTEN* располагается на 10 хромосоме в области 10q23.31, содержит 9 экзонов и переменный экзон 5b, который не включается в основной транскрипт *PTEN* [74]. Наиболее часто мутации происходят в 5-8 экзонах гена, то есть в области, кодирующей каталитический или C2-домен фосфатазы, что значительно снижает или инактивирует каталитическую способность фермента [75, 76]. Обнаружены несинонимичные замены (*c.375A>T*, *c.388C>T*, *c.493G>T*, *c.540C>G*, *c.686C>G*) и мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания (*c.944_945insCT*) [76–80].

Мутации гена *PTEN* выявлены при многих онкологических заболеваниях [36, 47, 49–

55, 81], но высокая частота встречаемости их характерна для эндометриальной карциномы (30–50%) [50, 51] и различных форм глиобластомы (15–30%) [49, 82]. В отличие от этих опухолей, мутации гена *PTEN* при раке легкого происходят реже [83, 84]. Некоторыми исследователями показано, что частота мутаций гена *PTEN* (10,2%) у пациентов с плоскоклеточным раком легкого сопоставима с частотой мутаций гена *KRAS* (9,4%) у пациентов с аденокарциномой, причем мутации *PTEN* обнаружены только у курильщиков [83, 85].

Возникновение мутаций в генах *PI3K* и *PTEN* является ключевым механизмом в активации сигнального пути *PI3K/Akt/mTOR* и, как следствие, влияет на развитие опухолей.

Заключение

Описанные сигнальные пути представляют собой сложные каскады активирующих молекул и их функционирование, которое начинается с распознавания факторов роста соответствующими рецепторами и заканчивается запуском экспрессии генов, отвечающих за пролиферацию клетки. Опухолевая клетка нуждается в постоянной активации сигнального пути.

Это может обеспечиваться различными молекулярными механизмами: мутациями и амплификацией генов, повышенной активностью транскрипции. Повреждение гена и, как следствие, структурный дефект сигнальных белков, способный зафиксировать его в постоянно активном состоянии — один из главных механизмов канцерогенеза. Автономная стимуляция внутриклеточных сигнальных путей приводит не только к усилению пролиферации клеток, но также регулирует такие функции, как выживание, дифференциация, рост и подвижность клетки [4]. С учетом системного характера онкопатологии и возможности активации нескольких альтернативных сигнальных путей необходимо использовать комплексный подход для разработки более специфичных и чувствительных молекулярных маркеров, которые могут быть использованы для прогноза течения онкологических заболеваний.

Список использованных источников

1. Croce, C.M. Oncogenes and cancer / C.M. Croce // New Engl J Med. — 2008. — Vol. 358, № 5. — P. 502–511.

2. Копнин, Б.П. Основные свойства неопластической клетки и базовые механизмы их возникновения / Б.П. Копнин // Практическая онкология. — 2002. — Т. 3, № 4. — С. 229–235.
3. Лихтенштейн, А.В. Генетические дефекты как маркеры опухолевого роста / А.В. Лихтенштейн, Г.И. Потапова // Молекулярная биология. — 2003. — Т. 7, № 2. — С. 181–193.
4. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // Cell. — 2011. — Vol. 144. — P. 646–674.
5. Sporn, M. Autocrine growth factors and cancer / M.B. Sporn, G.J. Todaro // Nature. — 1985. — Vol. 313, № 6005. — P. 745–747.
6. Stout, T.J. High-throughput structural biology in drug discovery: protein kinases / T.J. Stout, P.G. Foster, D.J. Matthews // Curr Pharm Des. — 2004. — Vol. 10, № 10. — P. 1069–1082.
7. Capra, M. Frequent Alterations in the Expression of Serine/Threonine Kinases in Human Cancers / M. Capra // Cancer Res. — 2006. — Vol. 66, № 16. — P. 8147–8154.
8. Epidermal growth factor receptor pathway mutation and expression profiles in cervical squamous cell carcinoma: therapeutic implications / S. Bumrungrathai [et al.] // J Transl Med. — 2015. — Vol. 13, № 244.
9. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in Solid Tumor Malignancies / K. Mette [et al.] // Biodrugs. — 2012. — Vol. 26, № 2. — P. 83–99.
10. Имянитов, Е.Н. Стандартные и потенциальные предиктивные маркеры при опухолях желудочно-кишечного тракта / Практическая Онкология, Т. 13, № 4 — 2012. — С. 219–228.
11. Majem, M., Pallarès, C. An update on molecularly targeted therapies in second-and third-line treatment in non-small cell lung cancer: focus on EGFR inhibitors and anti-angiogenic agents // Clin Transl Oncol. — 2013. — Vol. 15, № 5. — P. 343–357.
12. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer / S.V. Sharma [et al.] // Nat. Rev. Cancer. — 2007. — Vol. 7, № 3. — P. 169–181.
13. Kondo, I. Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13-q22 region of chromosome 7 / I. Kondo, N. Shimizu // Cytogenet. Cell Genet. — 1983. — Vol. 35, № 1. — P. 9–14.
14. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers / H. Shigematsu [et al.] // Int. J. Cancer. — 2006. — Vol. 118. — P. 257–262.
15. Mármol, I. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer / I. Mármol [et al.] // Int J Mol Sci. — 2017. — Vol. 18, № 1.
16. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers / K. Aldape [et al.] // Acta Neuropathol. — 2015. — Vol. 129, № 6. — P. 829–848.
17. Tjulandin, S. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung cancer: ten years later / S. Tjulandin, D. Nosov // Malign. Tumours. — 2011. — Vol. 1, № 2. — P. 41–48.
18. Roberts, P.J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer / P.J. Roberts, C.J. Der // Oncogene. — 2007. — Vol. 26. — P. 3291–3310.
19. Roberts, P.J. *KRAS* mutation: should we test for it, and does it matter? / P.J. Roberts, T.E. Stinchcombe // J. Clin. Oncol. — 2013. — Vol. 31, № 8. — P. 1112–1121.
20. Impact of *KRAS* Mutations on Clinical Outcomes in Pancreatic Cancer Patients Treated with First-line Gemcitabine-Based Chemotherapy / S.T. Kim [et al.] // Mol Cancer Ther. — 2011. — Vol. 10, № 10. — P. 1993–1999.
21. *KRAS*-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers / A.I. Phipps [et al.] // British Journal of Cancer. — 2013. — Vol. 108, № 8. — P. 1757–1764.
22. BRAF and RAS Mutations in Human Lung Cancer and Melanoma / M.S. Brose [et al.] // Cancer Res Dec. — 2002. — Vol. 62, № 23. — P. 6997–7000.
23. Molecular Epidemiology of *EGFR* and *KRAS* Mutations in 3,026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-Related *KRAS*-Mutant Cancers / S. Dogan [et al.] // Clin Cancer Res Nov. — 2012. — Vol. 18, № 22. — P. 6169–6177.
24. Naidoo, J. *KRAS*-Mutant Lung Cancers in the Era of Targeted Therapy / J. Naidoo, A. Drilon // Adv Exp Med Biol. — 2016. — Vol. 893. — P. 155–178.
25. Lech, G. The role of tumor markers and biomarkers in colorectal cancer / G. Lech,

- R. Slotwinski, I.W. Krasnodebski // *Neoplasma*. — 2014. — Vol. 61, № 1. — P. 1–8.
26. The status of *KRAS* mutations in patients with non-small cell lung cancers from mainland China / M. Li [et al.] // *Oncology Reports*. — 2009. — Vol. 22. — P. 1013–1020.
27. Frequency and Distinctive Spectrum of *KRAS* Mutations in Never Smokers with Lung Adenocarcinoma / G.J. Riely [et al.] // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. — 2008. — Vol. 14, № 18. — P. 5731–5734.
28. COSMIC database [Electronic resource], 2019. — Mode of access: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. — Date of access: 24.04.2019.
29. Oxnard, G. R. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer / G.R. Oxnard, A. Binder, P.A. Jänne // *J. Clin. Oncol.* — 2013. — Vol. 31, № 8. — P. 1097–1104.
30. Yu, J.S. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signaling in pluripotency and cell fate determination / J.S. Yu, W. Cui // *Development*. — 2016. — Vol. 143, № 17. — P. 3050–3060.
31. Sarris, E.G. The Biological Role of PI3K Pathway in Lung Cancer / E.G. Sarris, M.W. Saif, K.N. Syrigos // *Pharmaceuticals (Basel)*. — 2012. — Vol. 5, № 11. — P. 1236–1264.
32. Alayev, A. mTOR signaling for biological control and cancer / A. Alayev, M.K. Holz // *J. Cell Physiol.* — 2013. — Vol. 228. — P. 1658–1664.
33. Thorpe, L.M. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting / L.M. Thorpe, H. Yuzugullu, J.J. Zhao // *Nat Rev Cancer*. — 2015. — Vol. 15, № 1. — P. 7–24.
34. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon / M. Cervello [et al.] // *Oncotarget*. — 2012. — Vol. 3. — P. 236–260.
35. Targeting the Liver Kinase B1/AMP-Dependent Kinase pathway as a Therapeutic Strategy for Hematological Malignancies / A.M. Martelli [et al.] // *Expert Opinion Therapeutic Targets*. — 2012. — Vol. 16. — P. 729–742.
36. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: Rationale and importance to inhibiting these pathways in human health / W.H. Chappell [et al.] // *Oncotarget*. — 2011. — Vol. 2, № 3. — P. 135–164.
37. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging / L.S. Steelman [et al.] // *Aging*. — 2011. — Vol. 3. — P. 192–222.
38. Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance / S. Hafsi [et al.] // *Int J Oncol.* — 2012. — Vol. 40. — P. 639–644.
39. Essential role of class II phosphatidylinositol-3-kinase-C2alpha in sphingosine 1-phosphate receptor-1-mediated signaling and migration in endothelial cells / K. Biswas [et al.] // *J Biol Chem*. — 2013. — Vol. 288. — P. 2325–2339.
40. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation / A.G. Bader [et al.] // *Nat Rev Cancer*. — 2005. — Vol. 5. — P. 921–929.
41. Shaw, R.J. Ras, PI(3)K and mTOR signaling controls tumour cell growth / R.J. Shaw, L.C. Cantley // *Nature*. — 2006. — Vol. 441. — P. 424–430.
42. mTOR kinase structure, mechanism and regulation / H. Yang [et al.] // *Nature*. — 2013. — Vol. 497. — P. 217–223.
43. PtdIns(3,4,5)P3-dependent activation of the mTORC2 kinase complex / P.Liu [et al.] // *Cancer Discov.* — 2015. — Vol. 5. — P. 1194–1209.
44. Laplante, M. mTOR signaling in growth control and disease. M. Laplante, D.M. Sabatini // *Cell*. — 2012. — Vol. 149. — P. 274–293.
45. Leslie, N.R. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it / N.R. Leslie, C.P. Downes // *Biochemical Journal*. — 2004. — Vol. 382, № 1. — P. e1–11.
46. Gao, T. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth / T. Gao, F. Furnari, A.C. Newton // *Mol Cell*. — 2005. — Vol. 18, № 1. — P. 13–24.
47. Keniry, M. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy / M. Keniry, R. Parsons // *Oncogene*. — 2008. — Vol. 27, № 41. — P. 5477–5485.
48. PTEN C-terminal deletion causes genomic instability and tumor development / Z. Sun [et al.] // *Cell Rep*. — 2014. — Vol. 6, № 5. — P. 844–854.
49. Correction of *PTEN* mutations in glioblastoma cell lines via AAV-mediated gene editing / V.K. Hill [et al.] // *PLoS ONE*. — 2017. — Vol. 12, № 5. — P. e0176683.

50. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma // C. Kandoth [et al.] // Nature. — 2013. — Vol. 497, № 7447. — P. 67–73.
51. *PTEN* sequence analysis in endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma in slovak women / H. Gbelcová [et al.] // Analytical Cellular Pathology (Amsterdam). — 2015. — Vol. 2015. — P. e746856.
52. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer / D. Robinson [et al.] // Cell. — 2015. — Vol. 161, № 5. — P. 1215–1228.
53. *PTEN* inactivation in lung cancer cells and the effect of its recovery on treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors / R. Noro [et al.] // International journal of oncology. — 2007. — Vol. 31, № 5. — P. 1157–1163.
54. *PTEN* mutations and relationship to *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS* and *TP53* mutations in non-small cell lung cancers / G. Jin [et al.] // Lung Cancer. — 2010. — Vol. 69, № 3. — P. 279–283.
55. *PTEN* mutation, methylation and expression in breast cancer patients / H. Y. Zhang [et al.] // Oncology Letters. — 2013. — Vol. 6, № 1. — P. 161–168.
56. Loss of *PTEN* expression in breast cancer: association with clinicopathological characteristics and prognosis / S. Li [et al.] // Oncotarget. — 2017. — Vol. 8, № 19. — P. 32043–32054.
57. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1 / A. Sofer [et al.] // Mol. Cell Biol. — 2005. — Vol. 25, № 14. — P. 5834–5845.
58. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer / A. Carracedo [et al.] // J. Clin. Invest. — 2008. — Vol. 118, № 9. — P. 3065–3074.
59. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3-OH kinase / T. Nobukuni [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102, № 40. — P. 14238–14243.
60. Zhao, L. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation / L. Zhao, P. K. Vogt // Oncogene. — 2008. — Vol. 27, № 41. — P. 5486–5496.
61. Knockin of mutant *PIK3CA* activates multiple oncogenic pathways / J. P. Gustin [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2009. — Vol. 106, № 8. — P. 2835–2840.
62. *PIK3CA* Mutations Frequently Coexist with *EGFR/KRAS* Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer and Suggest Poor Prognosis in *EGFR/KRAS* Wildtype Subgroup / L. Wang [et al.] // PLoS ONE. — 2014. — Vol. 9, № 2. — P. e88291.
63. Mukohara, T. *PI3K* mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications / T. Mukohara // Breast Cancer: Targets and Therapy. — 2015. — Vol. 7. — P. 111–123.
64. *PIK3CA* mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α , PR and ERBB2-based subgroups / M. Cizkova [et al.] // Breast Cancer Research. — 2012. — Vol. 14, № 1. — P. e1–9.
65. Rare mutations in the *PIK3CA* gene contribute to aggressive endometrial cancer / D. Konstantinova [et al.] // DNA Cell Biol. — 2010. — Vol. 29, № 2. — P. 65–70.
66. *PIK3CA* exon 9 mutations associate with reduced survival, and are highly concordant between matching primary tumors and metastases in endometrial cancer / S. Mjos [et al.] // Scientific Reports. — 2017. — Vol. 7. — P. e10240.
67. *PIK3CA* gene alterations in bladder cancer are frequent and associate with reduced recurrence in non-muscle invasive tumors / M. Dueñas [et al.] // Mol. Carcinog. — 2015. — Vol. 54, № 7. — P. 566–576.
68. Prognostic and clinical impact of *PIK3CA* mutation in gastric cancer: pyrosequencing technology and literature review / K. Harada [et al.] // BMC Cancer. — 2016. — Vol. 16. — P. e400.
69. Cathomas, G. *PIK3CA* in colorectal cancer / G. Cathomas // Frontiers in Oncology. — 2014. — Vol. 4. — P. e35.
70. Prognostic role of tumor *PIK3CA* mutation in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis / Z. B. Mei [et al.] // Annals of Oncology. — 2016. — Vol. 27, № 10. — P. 1836–1848.
71. *PIK3CA* mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies / M. Scheffler [et al.] // Oncotarget. — 2015. — Vol. 6, № 2. — P. 1315–1326.
72. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap) / S. Dearden [et al.] // Ann. Oncol. — 2013. — Vol. 24, № 9. — P. 2371–2376.

73. Squamousness: Next-generation sequencing reveals shared molecular features across squamous tumor types / M. Schwaederle [et al.] // *Cell Cycle*. — 2015. — Vol. 14, № 14. — P. 2355–2361.
74. Sharrard, R.M. Alternative splicing of the human *PTEN/MMAC1/TEP1* gene / R.M. Sharrard, N.J. Maitland // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2000. — Vol. 1494, № 3. — P. 282–285.
75. Leslie, N.R. Inherited *PTEN* mutations and the prediction of phenotype / N.R. Leslie, M. Longy // *Semin. Cell Dev. Biol.* — 2016. — Vol. 52. — P. 30–38.
76. A clinical scoring system for selection of patients for *PTEN* mutation testing is proposed on the basis of a prospective study of 3042 probands / M. H. Tan [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 2011. — Vol. 88, № 1. — P. 42–56.
77. *PTEN* mutation spectrum in breast cancers and breast hyperplasia / J. Yang [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* — 2010. — Vol. 136, № 9. — P. 1303–1311
78. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorder / B.J. O’Roak [et al.] // *Science*. — 2012. — Vol. 338. — P. 1619–1622.
79. PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia / L.A. Jansen [et al.] // *Brain*. — 2015. — Vol. 138. — P. 1613–1628.
80. Subtle variations in *Pten* dose determine cancer susceptibility / A. Alimonti [et al.] // *Nat. Genet.* — 2010 — Vol. 42. — P. 454–458.
81. *PTEN* C-terminal deletion causes genomic instability and tumor development / Z. Sun [et al.] // *Cell Rep.* — 2014. — Vol. 6, № 5. — P. 844–854.
82. *PTEN* gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: a meta-analysis / F. Han [et al.] // *Onco Targets Ther.* — 2016. — Vol. 13, № 9. — P. 3485–3492.
83. *PTEN* and *PI3K/AKT* in non-small-cell lung cancer / C. Pérez-Ramírez [et al.] // *Pharmacogenomics*. — 2015. — Vol. 16, № 16. — P. 1843–1862.
84. Mutations in *TP53*, *PIK3CA*, *PTEN* and other genes in *EGFR* mutated lung cancers: Correlation with clinical outcomes / P.A. VanderLaan [et al.] // *Lung Cancer*. — 2017. — Vol. 106. — P. 17–21.
85. Hot spot mutations in Finnish non-small cell lung cancers / S. Mäki-Nevala [et al.] // *Lung Cancer*. — 2016. — Vol. 99. — P. 102–110.

A.P. Mikhalenka, A.N. Shchayuk, A.V. Kilchevsky

SIGNALING PATHWAYS: A MECHANISM FOR REGULATING THE PROLIFERATION AND SURVIVAL OF TUMOR CELLS (Review Article)

Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus

The review presents contemporary literature data on the main structural components of intracellular signaling pathways: auto/paracrine growth factors, their tyrosine kinase receptors and underlying signaling proteins. The main cellular signaling pathways (PI3K/Akt / mTOR and RAS/RAF/MAPK) and molecular genetic disorders of the key components of these pathways leading to the development of cancer are described in detail. Literature analysis has shown that one of the main mechanisms of carcinogenesis is the constant activation of a signaling pathway provided by various molecular mechanisms: gene amplification and mutations, an increased transcription activity of the main signaling cascade components.

Key words: PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, RAS/RAF/MAPK signaling pathway, tumor cells, growth factors, mutations.

Дата поступления статьи: 5 февраля 2019 г.

И.С. Гордей, О.М. Люсиков, И.А. Гордей

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ (Обзорная статья)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

В статье приведен обзор современной литературы по молекулярно-генетическим изменениям генома при полиплоидизации растений. Освещены такие аспекты, как элиминация части ядерной ДНК, активация мобильных элементов, изменение уровня метилирования ДНК, полиморфизм по отдельным нуклеотидам, функциональная диверсификация, изменение экспрессии и «замолкание» дублицированных генов у полиплоидных растений. Эти изменения генетического аппарата вызывают наследственно обусловленное разнообразие ботанико-морфологических, анатомических, цитологических, физиологических, биохимических и других признаков и свойств растительных организмов, что создает в итоге богатый разнообразный исходный материал для расширения генофонда и селекции новых сортов.

Ключевые слова: полиплоидия, полиморфизм, геном, молекулярный анализ, ДНК, дубликация, экспрессия.

Введение

Исследования, проведенные в последние годы, убедительно демонстрируют, что полиплоидия — это больше, чем простое суммирование геномов. Изучение различных растительных систем как естественного, так и искусственного происхождения с применением молекулярных технологий показало, что генезис полиплоидных форм сопровождается кардинальными геномными преобразованиями и модификациями [1, 2].

С помощью геномного секвенирования проанализированы различные группы эукариот, в том числе дрожжи [3–5], растения [6] и позвоночные [7] на предмет древних геномных дубликаций. Во всех четырех эукариотических царствах (растений, животных, грибов и протистов) доля генов, сохранившихся в виде дублицированных копий, варьирует от 10 до 50% и чаще всего коррелирует со временем, прошедшим с момента дубликации [5].

В последние годы получено множество данных на синтетических полиплоидах, которые подтверждают такие геномные изменения при полиплоидизации, как перестановка целых последовательностей ДНК, элиминация генов, диверсификация генов, изменения в ДНК-метилировании, активация мобильных генетических элементов и др. [8–13].

Изменение С-значения

(элиминация ДНК) у полиплоидов

С-значение организма — это количество ДНК, содержащееся в нереплицируемом ядре гамет [14, 15].

В настоящее время С-значение ДНК известно более чем для 3500 видов покрытосеменных. У различных покрытосеменных оно может различаться в 1000 раз: от 0,11 пг у *Fragaria viridis* до 127,4 пг у *Fritillaria assyriaca* [14–17]. Теоретически, при одинаковых условиях, полиплоиды должны иметь большее С-значение, чем их диплоидные предшественники, которое прямо пропорционально уровню ploидности. Кроме того, размер гаплоидного генома должен быть одинаковым на всех уровнях ploидности.

С открытием первой электронной базы данных по С-значению ДНК у покрытосеменных в 1997 году стало возможным изучать изменение количества ДНК в результате полиплоидизации у различных видов. В общей сложности электронная база С-значения включала данные по количеству ДНК 2185 диплоидов и 853 полиплоидов [14–16]. Первый такой анализ 2452 таксонов покрытосеменных (1794 диплоида и 658 полиплоидов) был проделан М. Bennett, L. Hanson и I. Leitch [18, 19]. Ученые провели анализ всех уровней ploидности (от $2x$ до $12x$), который показал, что среднее количество ДНК не уве-

личивается прямо пропорционально увеличению уровня плоидности. Во многих случаях было обнаружено, что часть ДНК элиминирует с увеличением уровня плоидности, более того, обнаружена тенденция уменьшения гаплоидного размера генома (по С-значению).

В. Bremer et al. [20] провели анализ полиплоидных рядов шести основных монофилетических подклассов покрытосеменных: *Poaceae* (однодольные), *Alliaceae* (однодольные), *Ranunculaceae* (базальные эвдикоты), *Fabaceae* (Розиды), *Solonaceae* (Астериды) и *Asteraceae* (Астериды). Каждый из них анализировался отдельно. Во всех случаях обнаружена элиминация ДНК у полиплоидов. Дальнейший анализ выявил аналогичные результаты [20].

Также установлено, что в результате структурно-функциональной стабилизации полиплоидного генома у зиготических тетраплоидов ржи происходит элиминация части ядерной ДНК, количество которой в зависимости от генотипа к C₆-C₇ поколениям составляет от 8,8 до 15,0%.

Обобщая все полученные данные, можно сказать, что относительная редукция размера генома у полиплоидов является широко распространенным биологическим явлением. Редукция размера генома у полиплоидов также подтверждается результатами, полученными на основе секвенирования целых полиплоидных геномов растений, животных, грибов и человека, с помощью которых обнаружены многочисленные потери целых генов. Например, анализ последовательности генома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показал, что они являются вырожденными (дегенерировавшими) тетраплоидами, в которых сохранилось только 15% дублированных генов после полиплоидизации, произошедшей примерно 150 млн лет назад [21, 22]. Анализ последовательности генома человека указывает на то, что он является палеоктоплоидом, у которого элиминировано 50% дублированных генов [23].

Секвенирование генома *Arabidopsis*, который долгое время считался классическим диплоидом и имеет малое количество ДНК (всего 0,16 пг), показало, что он не только является полиплоидом, но и претерпел по крайней мере два, а, возможно, три или четыре акта дубликации генома в течение своей эволюции [24–26].

Последние исследования, проведенные на *Arabidopsis*, подтвердили, что его геном в

своей эволюции подвергся этапному удвоению [27]. Вместе с тем число хромосом в современных растениях *Arabidopsis* вовсе не соответствует их полному удвоенному количеству. У *Arabidopsis* сохранилось только 30% дублированных генов с момента последней полиплоидизации, которая произошла менее 86 млн лет назад [26]. Это дает основание предположить, что полиплоидия сопровождается удалением некоторых избыточных генов. Например, анализ генома *Arabidopsis* показал, что некоторые классы генов, вовлеченные в транскрипцию и трансдукцию, были сохранены, тогда как другие классы генов, принимающие участие в восстановлении ДНК и белков органелл, были утеряны [10].

S. Anssour et al. [28] определили количество ДНК (С-значение) у диплоидов и соответствующих синтетических тетраплоидов *Nicotiana attenuate* и *Nicotiana obtusifolia* в 5-ом поколении после полиплоидизации. Количество ДНК у диплоидов *Nicotiana attenuate* и *Nicotiana obtusifolia* составило 3,31 и 1,46 пг, у созданных на их основе тетраплоидов — 5,98 и 2,64 пг соответственно. Таким образом, отношение количества ДНК тетраплоида *Nicotiana attenuate* к количеству ДНК соответствующего диплоида оказалось равным 1,8, у *Nicotiana obtusifolia* — 1,6. Это свидетельствует об элиминации части ДНК у созданных тетраплоидов уже в пятом поколении после полиплоидизации.

Генные потери в результате дубликации генома обнаружены в недавних исследованиях кукурузы [29, 30]. У нее обнаружена элиминация более половины дублированных генов в течение последних 11 млн лет после полиплоидизации.

Выявлены случаи элиминации генов 18S-26S рДНК у некоторых полиплоидных видов, таких как *Triticeae*, *Nicotiana*, *Festuca*, *Brassica*, *Glycine* и *Scilla* [1]. Доказательства элиминации отдельных генов у полиплоидов также были получены с помощью методов сравнительного картирования [25, 31]. Кроме того, Н. Shaked et al. [32], а также Н. Ozkan et al. [33] выявили элиминацию малокопийных некодирующих фрагментов ДНК на AFLP-профилях у полиплоидов *Aegilops* и *Triticum*, что вызвало уменьшение количества ДНК примерно на 6% [34].

В первых двух поколениях синтетического автополиплоида *Phlox drummondii* обнаруже-

на потеря 17% ДНК, в третьем поколении — 25% [35]. Уменьшение размера генома сопровождалось существенным увеличением завязываемости семян, что свидетельствует о наличии адаптивного процесса диплоидизации у автополиплоида.

Как у синтетического, так и у естественного автополиплоида *Elymus elongatus* при нормальной бивалентной конъюгации обнаружена потеря 10% ДНК по сравнению с диплоидными родителями [36]. Редукция ДНК происходит уже в первых поколениях после дубликации генома у вышеописанных видов и, возможно, каким-то образом способствует нормальной бивалентной конъюгации.

У синтетического автотетраплоида *Paspalum notatum* обнаружена элиминация 9,5% ДНК по сравнению с диплоидными предшественниками [37]. У подвида ячменя *murinum* (*Hordeum murinum*) при строго бивалентной конъюгации хромосом выявлена элиминация 23% ДНК [38]. У давно сформировавшихся природных автополиплоидов *Santolina pectinata* обнаружено значительное уменьшение длины хромосом [39].

Однако при исследовании полиплоидов хлопка *Gossypium* [40, 41] и *Spartina anglica* [42, 43] не удалось выявить каких-либо фактов элиминации последовательностей ДНК. Поэтому можно предположить, что подобное явление не является универсальным следствием полиплоидизации.

У эукариот основную фракцию генома составляют некодирующие последовательности ДНК. Как показали последние исследования, именно эти последовательности могут элиминироваться после формирования полиплоида [32, 33]. Кроме того, с помощью цитологических исследований выявлена потеря целых сегментов хромосом у полиплоидов. Например, J. Gustafson и M. Bennett [44] выявили потерю до 100% теломерного гетерохроматина у хромосом ржи (содержащих преимущественно высокоповторяющиеся последовательности ДНК) в геноме синтетического полиплоида тритикале.

По мнению некоторых авторов [15–17], основным фактором, способствующим редукции размера генома у полиплоидов, может быть обычный естественный отбор, благоприятствующий видам с уменьшенным С-значением (количеством ДНК). После полиплоидизации, которая приводит к удвоению количества ДНК,

уменьшение С-значения может означать, что отбор благоприятствует индивидуумам с редуцированным количеством ДНК (т. е. тем, у которых более эффективно действуют механизмы элиминации ДНК) [45].

В последние годы с помощью молекулярных методов удается выявлять механизмы, которые приводят к увеличению и уменьшению количества ДНК [46, 47]. Помимо полиплоидии, увеличение количества ДНК может происходить преимущественно за счет амплификации транспозонов, особенно ретротранспозонов. Однако механизмы, приводящие к потере ДНК, мало изучены. Элиминация части ДНК может быть обусловлена различными рекомбинационными механизмами, такими как неравные и «незаконные» гомологичные рекомбинации, активация ретротранспозонов [48]. Еще одним механизмом редукции размера генома у тетраплоидов может быть цитомиксис. Установлено [49], что полиплоидные ядра тапетума и синцитии, будучи мощными акцепторами, способны конкурировать с микроспорами и направлять транслокацию хроматина в свою сторону. Кроме того, у полиплоидных форм довольно распространены делеции определенных аллелей, что объясняется гомозиготизацией многих субхромосомных регионов, выявляющей у полиплоидов инбредную депрессию [50].

Таким образом, исходя из всего вышеизложенного, можно сделать вывод, что элиминация ДНК, или редукция размера генома, — широко распространенное явление, встречающееся в полиплоидных популяциях покрытосеменных.

Функциональная диверсификация дублицированных генов. Изменение экспрессии дублицированных генов

Из вышеизложенного следует, что многие дублицированные гены могут элиминироваться в процессе эволюции, однако, некоторые сохраняются на протяжении миллионов лет. Это обусловлено большой функциональной ролью дублицированных генов в эволюции и предполагает, что полиплоидия обеспечивает генетическую изменчивость для эволюции посредством функционального расхождения дублицированных генов (функциональной диверсификации) [51].

Возможны два варианта функциональной диверсификации дублицированных генов:

1) неофункционализация, при которой один из дублицированных генов приобретает новую функцию, в то время как другой сохраняет старую, «древнюю» функцию;

2) субфункционализация, при которой оба дублицированных гена необходимы для выполнения функции, которую ранее обеспечивал один предковый ген. Иными словами, функция предкового гена распределена между двумя дочерними копиями [52].

Помимо диверсификации может произойти консервация дублицированных генов, при которой обе копии сохраняются в неизменном состоянии [53]. Однако наиболее вероятной судьбой дублицированных генов является псевдогенизация («замолкание» генов) — утрата функциональной активности дублицированной копии (рисунок) [54].

Одним из наиболее ярких примеров неофункционализации является судьба дубликата гена панкреатической рибонуклеазы у обезьян подсемейства колобусов (*Colobinae*). Эти обезьяны питаются в основном листьями, поэтому верхняя часть их желудка содержит различные симбиотические бактерии, которые разлагают растительную клетчатку, тем самым способствуя пищеварению. Активное участие в этом процессе принимает РНКазы 1В, способствуя расщеплению бактериальной РНК.

У африканских и азиатских представителей подсемейства колобусов произошли независимые дубликации гена *RNASE 1*. Это событие привело к появлению двух генов, *RNASE 1A* и *RNASE 1B*. Фермент РНКазы 1А, кодируемый первым геном, сохранил свою способность деградировать двунитевую РНК и за счет этого сохранил антивирусные функции, в то время как РНКазы 1В, кодируемый геном *RNASE 1B*, эту функцию утратил и приобрел некую новую [55–57].

В 2008 году генетики из Университета Дюка (США) обнаружили неофункционализацию гена дигидрофлавонол-4-редуктазы (*DFR*) у ипомеи — рода растений из семейства выюнкковых [58]. Фермент этого гена восстанавливает различные флавоноиды, превращая их в красные, пурпурные и синие пигменты-антоцианы. Эту функцию он выполняет почти у всех цветковых растений. Кроме того, фермент катализирует некоторые другие химические реакции.

У ипомеи ген *DFR* присутствует в виде трех копий, расположенных вплотную друг к другу (*DFR-A*, *DFR-B*, *DFR-C*). У некоторых выюнкковых этот ген имеется только в одном экземпляре. На начальных этапах эволюции этот ген подвергся двум последовательным tandemным дубликациям. Сначала возникло две копии, одна из которых стала геном *DFR-B*, а вторая дублицировалась еще раз и превратилась в *DFR-A* и *DFR-C*. Авторы выявили значимые

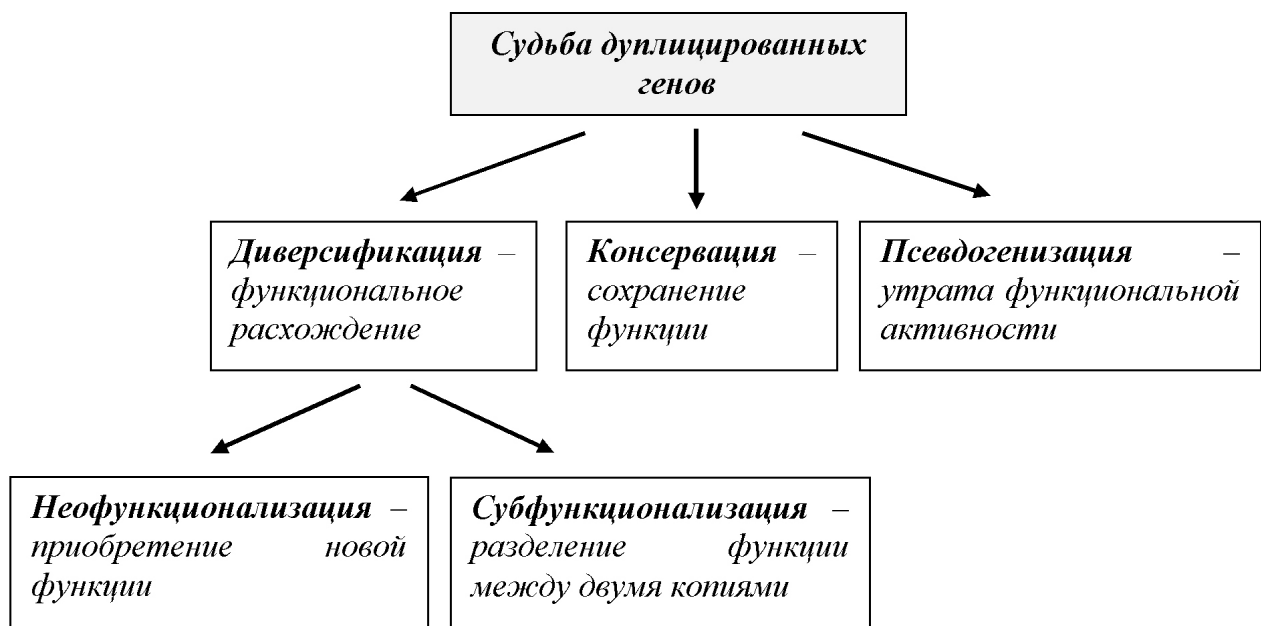


Рис. Судьба дублицированных генов

замены нуклеотидов у генов *DRF-A* и *DRF-C*. У гена *DRF-B* значимых замен выявлено не было. Авторы изучили каталитическую активность белков *DFR-A*, *DFR-B* и *DFR-C* ипомеи. Все белки проверялись на способность восстанавливать пять разных субстратов (веществ из группы флавоноидов). Оказалось, что белок *DFR-B* ипомеи работает эффективно со всеми пятью субстратами. Белки *DFR-A* и *DFR-C* вообще не проявляют каталитической активности к этим пяти субстратам.

Очевидно, что гены *DFR-A* и *DFR-C* утратили старую функцию (работы с флавоноидами) и приобрели новую, т. е. произошла их неофункционализация — приобретение новой функции вследствие дубликации. Авторы установили, что изменение функции данных белков связано с заменой аспарагина на другие аминокислоты в 133-й позиции. Например, в белке *DFR-C* здесь всегда стоит изолейцин. Однако новые функции данных генов не установлены [58].

Молекулярные механизмы, приводящие к субфункционализации, до сих пор детально не исследованы. Однако, благодаря анализу геномов близкородственных видов, в частности сравнению генов, участвующих в утилизации галактозы у *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluyveromyces lactis*, удалось проследить эволюцию пары дублированных генов у *S. cerevisiae* и показать их практически полную субфункционализацию [59].

Дубликация всего генома *S. cerevisiae* привела к появлению двух идентичных копий гена *GAL1/3*. У современных представителей *S. cerevisiae* ген *GAL1* кодирует фермент галактокиназу, так как он связывает репрессор (*Gal80*) фактора транскрипции *Gal4*, активирующего путь утилизации галактозы. Оба гена произошли из одного бифункционального гена, при этом *Gal3* потерял ферментативную активность, а *Gall* — регуляторные свойства, но в сумме функция гена *Gal* не изменилась, т. е. произошла субфункционализация дублированной копии — разделение регуляторной и ферментативной функции между двумя генами [59].

Полный анализ функциональной изменчивости дублированных генов у *Arabidopsis* проведен G. Blanc и K. Wolfe [60]. Они установили, что более половины пар генов, обра-

зовавшихся в результате полиплоидии, имеют различную степень экспрессии. Авторы также установили, что около 62% пар генов подверглись функциональной диверсификации. Дублированные гены, вероятно, приобретают новую полезную для организма функцию посредством мутационной изменчивости.

Показано, что функциональная диверсификация дублированных генов коррелирует с замещениями аминокислот в белках, синтезируемых этими генами [61, 62]. Аминокислотные замещения были обнаружены, например, в калхон-синтазе (*Chs*) у семейств *Petunia* и *Ipomoea*, что является отражением функциональной диверсификации дублированных генов [63, 64].

В некоторых исследованиях данные по секвенированию последовательностей сопоставлялись с данными о специфичности ферментного субстрата. Показательным примером в этом отношении является анализ дифференциации среди генов семейства калхон-синтетазы (*Chs*) у *Asteraceae*. У него обнаружены новые белки, которые отличаются от других белков, кодируемых генами семейства *Chs*. Аминокислотная последовательность белка, кодируемого дублированным геном *Chs* у полиплоида, только на 70% схожа с аминокислотной последовательностью белка, кодируемого геном *Chs* у диплоида [65].

R. Stupar et al. [66] изучили экспрессию порядка 9000 генов в синтетическом автополиплоидном ряду картофеля (*Solanum phureja*), который включал один гаплоид ($1x$), два диплоида ($2x$) и один тетраплоид ($4x$). Они обнаружили, что 10,5 и 10,6% генов имели различную степень экспрессии в листьях и кончиках корней соответственно на разных уровнях пloidности. Однако для большинства генов различия в их экспрессии наблюдались только между $1x$ и $2x$ уровнями пloidности ($1x < 2x = 4x$ и $1x > 2x = 4x$). Только у 12% генов уровень экспрессии увеличивался прямо пропорционально увеличению уровня пloidности ($1x < 2x < 4x$), а у 8% генов — уменьшался прямо пропорционально увеличению уровня пloidности ($1x > 2x > 4x$).

D. Pignatta et al. [67] исследовали влияние автополиплоидизации на экспрессию генов у трех различных линий автотетраплоида *Arabidopsis thaliana* и их соответствующих

диплоидов. Их результаты с использованием двух различных подходов (использование микрочипов и энхансерных ловушек) оказались противоречивыми: с помощью микроэррея не удалось выявить изменений в экспрессии ряда регуляторных генов, в то время как с помощью энхансерных ловушек выявлены изменения в экспрессии этих генов.

У синтетического автополиплоида *Isatis indigotica* с помощью микроэррея выявлены изменения в экспрессии у 4,2% последовательностей ДНК по сравнению с диплоидами [68].

L. Martelotto аналогичным методом провел анализ 9617 генов у синтетического автополиплоида *Penicillium notatum* и выявил изменения в экспрессии у 129 генов (1,34%) [69].

C. Parisod [38] с помощью AFLPs-анализа кДНК естественной популяции диплоидов, автотетраплоидов и автогексаплоидов *Helianthus decapetalus* выявил 6,6% различий в экспрессии проанализированных генов в сумме между тремя уровнями пloidности.

Практически все данные по изменению экспрессии генов у полиплоидов были получены путем транскрипционного профилирования. В последнее время для изучения экспрессии генов применяется протеомный анализ. A. Marmagne et al. [70] с помощью метода сравнительной протеомики показали, что в ранних поколениях ресинтезированного полиплоида *Brassica napus* 25 и 38% протеинов, синтезирующихся в корне и стебле соответственно, имеют неаддитивное количество относительно ожидаемой суммарной величины родительского значения, в то время как уровень транскрипции генов, кодирующих данные белки, был аддитивным. Это говорит об отсутствии прямой корреляции между уровнем экспрессии генов и количеством синтезируемого ими белка у полиплоидов.

Теоретически генетическая избыточность может ослаблять действие отбора на копии дублированных генов, что дает им возможность следовать по новой эволюционной траектории. Длительный дрейф генов, мутации, а также действие отбора чаще приводят к инактивации дублированных генов. В ряде случаев дублирование аллелей может играть положительную роль в адапционных процессах. Удвоенные аллели могут приобретать новую функцию (неофункционализация),

либо может произойти субфункционализация, т. е. копии гена отличаются по функциям друг от друга, но в сумме их функции не отличаются от предковых.

Консервация (сохранение) дублированных генов

Известно, что дублированные гены сохраняются в тех случаях, когда для нормального развития организма необходимы множество копий генов с одинаковой функцией, что позволяет синтезировать большие количества специфических РНК или белков [54]. Показано, что увеличение копий таких генов коррелирует с увеличением сложности организма [6]. Амплификация генов у микроорганизмов приводит к устойчивости к антибиотикам [71, 72], у растений — к гербицидам [73]. К наиболее известным примерам сохранения дублированных копий генов у самых различных организмов относятся гены рРНК, тРНК, гистонов [74].

Одним из наиболее интересных вопросов, связанных с сохранением дублированных копий генов, является следующий: происходит ли потеря генов случайно? Какие дубликаты теряются, а какие сохраняются после полиплоидизации? Например, около 13% дрожжевых генов сохранились в виде дублированных копий, причем большая их часть не нужна для обеспечения жизнеспособности [75]. Наиболее часто сохраняются дублированные гены, кодирующие такие белки, как циклины, компоненты пути сигнальной трансдукции, цитоплазматические рибосомные белки. Большинство из них характеризуется высоким уровнем экспрессии. Возможно, основным фактором отбора на сохранение генов в дублированном состоянии был отбор на увеличение уровня их экспрессии [76].

Анализ наименее древней дубликации генома у *Arabidopsis* выявил преимущественное сохранение генов, участвующих в транскрипции и сигнальной трансдукции, в то время как другие классы, вовлеченные в репарацию ДНК или кодирование белков органелл, чаще элиминировали [60]. Интересно, что гены, сохранившиеся в виде паралогов после конкретного цикла дубликации, имеют повышенную вероятность сохраниться после следующего цикла дубликации [77]. Таким образом, потеря дубликатов не является случайным процессом.

Псевдогенизация («замолкание» генов)

Гены, которые были удвоены путем полиплоидизации, могут экспрессироваться по-разному — один в большей степени, другой в меньшей либо происходит их полное «замолкание» (псевдогенизация) [78]. Псевдогенизация может произойти уже в первом поколении после полиплоидизации, хотя некоторые гены «замолкают» в более поздних поколениях.

Псевдогенизация генов может происходить в эволюции полиплоида [131, 79], но это явление стало широко исследоваться только тогда, когда белки стали использоваться в качестве генетических маркеров. Поскольку белки, кодируемые дублированными генами, легко можно разделить с помощью электрофореза, по электрофоретическим спектрам можно судить о степени генного «замолкания» [80, 81]. Такие анализы показали, что может произойти потеря экспрессии любого члена дублированной генной пары. Хорошо известен пример псевдогенизации локуса лейцинминопептидазы в результате дубликации у тетраплоида *Chenopodium* [82].

Из ряда данных, полученных в результате электрофоретических исследований белков, сделанных в последние несколько десятилетий, можно заключить, что у более поздних по происхождению полиплоидов обе копии дублированного гена обычно сохраняют экспрессию [81, 83]. Это видно на примере полиплоидного генома *Tragopogon*, произрастающего на западе США, который впервые появился там в начале 1900-х после интродукции диплоидного предшественника из Европы [84], а также на примере гексаплоидной пшеницы, сформировавшейся около 8 тыс. лет назад, у которой до сих пор экспрессируется большинство первоначально утроенных генов, хотя и здесь известны примеры псевдогенизации [85, 86], о чем далее и будет идти речь.

Однако у древних полиплоидов потеря экспрессии дублированных генов встречается как у растений, так и у животных. Например, предполагается, что у тетраплоидных катостомидных рыб около половины всех дублированных аллозимных локусов псевдогенизировалось за 50 млн лет с момента полиплоидизации [87]. У современной сои обнаружено «замолкание» до 25% дублиро-

ванных генов [88]. В некоторых исследованиях замечено постепенное снижение экспрессии дублированного гена фосфо-глюкозо-изомеразы у тетраплоида *Pellaea rufa* в сравнении с его диплоидными предшественниками [89].

Большинство эмпирических доказательств явления псевдогенизации дублированных генов получено в результате анализа белковых локусов, так как они являются наиболее простыми и легкодоступными генетическими маркерами [90]. На электрофоретических спектрах гексаплоидных линий пшеницы, имеющих 3 генома (A, B и D), переменным образом проявляются фрагменты высокомолекулярных глютеинов, кодируемых только двумя геномами из трех (B и D), что говорит о псевдогенизации соответствующих генов в гомеологичном A-геноме [91].

Известно множество примеров дубликации и последующей псевдогенизации рибосомальных генов в результате полиплоидии. У *Triticeae*, *Nicotiana*, *Festuca*, *Brassica*, *Glycine*, *Scilla* целые фрагменты 18S-26S и/или 5S рДНК вначале «замолчали» после полиплоидизации, а затем были полностью утрачены. Потеря фрагментов ДНК могла произойти посредством неравного межхромосомного кроссинговера или в результате делеций. Опираясь на вышеизложенное, «замолкание» генов можно рассматривать как отражение различных явлений, происходящих при дубликации, таких как процесс медленного «распада» генов, приводящий к формированию псевдогенов, геномные делеции целых фрагментов ДНК и, возможно, отдельных генов. «Замолкание» гена также может произойти в результате появления преждевременных стоп-кодона, накопления точковых мутаций и различных инсерций [92–97].

«Замолкание» генов может быть обусловлено эпигенетическими изменениями в процессе полиплоидизации [98]. S. Mudge et al. выявили «молчащие» репортерные трансгены у полиплоидных видов злаков [99]. Однако механизм «замолкания» этих генов был неизвестен. Позднее L. Khaitova et al. исследовали экспрессию целых семейств генов, кодирующих рРНК у пяти пентаплоидных видов шиповника (*Rosa canina*, *R. rubiginosa*, *R. dumalis*, *R. sherardii* and *R. caesia*) и одного тетраплоидного вида (*R. mollis*). Их данные показали, что для семейства генов, расположенных на

хромосомах, которые претерпевают бивалентную конъюгацию (у тетраплоида), характерна стабильная экспрессия. Гены, локализованные на унивалентных хромосомах (у пентаплоида), характеризовались различным уровнем эпигенетического «замолкания» [100].

Выявлено немало случаев «замолкания» генов посредством мутационных процессов. Например, процессы замолкания *PGI*-генов у *Clarkia* и хлорофиллсвязывающих *a/b*-генов у *Polystichum munitum* обусловлены многочисленными повреждениями замолкших генов, такими как точечные мутации, инсерции и делеции [101, 102]. Наиболее подробно описано формирование псевдогена у дуплицированного гена *PdiC2* у *Clarkia mildrediae* [101]. Из 23 экзонов этого гена было секвенировано 18. У девяти экзонов обнаружены индел-мутации (индел-мутации возникают при выпетливании во время репликации нуклеотидов праймера в случае инсерции, либо матрицы в случае делеции), что приводит к сдвигу рамки считывания и формированию стоп-кодона. Обнаружены делеции размером от 3 до 52 нуклеотидов, в некоторых случаях приводящие к потере экзон-интронных соединений, а также обнаружены 3 инсерции, в общем содержащие 8 пар нуклеотидов. Также обнаружена вырожденность интронов, которые содержали в общей сложности 21 инсерцию. Длина одной из них достигала 857 п. н. и имела вид петли, а также содержала прямые концевые (терминальные) повторы, что, предположительно, обусловлено наличием мобильных генетических элементов.

Гипотезы о потенциальной роли псевдогенов были высказаны достаточно давно. Так, предполагалось, что антисмысловая РНК, транскрибируемая с последовательности псевдогена, может взаимодействовать с мРНК, синтезируемой с кодирующей последовательности, что позволит регулировать экспрессию. Эти предположения подтвердились экспериментально [103, 104]. Предполагается, что эпигенетический сайленсинг может защищать дуплицированные копии от превращения в псевдогены и таким образом способствовать приобретению ими новых функций [105].

Активация мобильных элементов

Мобильные элементы (МЭ) также могут быть причиной псевдогенизации [106–108].

В ряде случаев были получены доказательства увеличения транспозиционной активности уже в первых поколениях полиплоидных растений [109–113]. Этот процесс затрагивает главным образом молодые и активные семейства МЭ с небольшой копийностью [111, 112]. В целом же пролиферация МЭ у полиплоидов носит строго избирательный характер и не приводит к общему «взрыву» транспозиционной активности [113, 114].

У гексаплоидной пшеницы, например, потеря экспрессии локуса глютенина *Glu-1* связана с инсерцией ретранспозона длиной 8 kb в кодирующую область данного гена. Как было показано, у табака замолкание гена нитрат-редуктазы вызвано инсерцией ретранспозона называемого *Tnt1*. Инсерции в регуляторных областях могут также изменять экспрессию генов, что было выявлено на примере изменения экспрессии гена *rbcS* гороха, регуляторного гена *R-s* кукурузы, гена нивеякалхон-синтазы у *Antirrhinum* и многих других. У автотетраплоида *Arabidopsis thaliana* с помощью микроэррея выявлена активация *En/Spm* транспозонов [109]. Следовательно, с полиплоидией может быть связано повышение активности мобильных элементов. Возможно, индукция «замолкания» генов мобильными элементами происходит у полиплоидов в большей степени, чем у диплоидов, что связано с эффектом буферизации при дупликации генома. МикроРНК (miRNA) посредством РНК-интерференции могут также индуцировать «замолкание» генов у полиплоида [1].

Реорганизация генома также может включать в себя транспозиции целых хромосомных сегментов. У автополиплоида *Hepatica nobilis* var. *pubescens* были обнаружены ассиметричные транспозиции, а также потери некоторых локусов рДНК [115]. В 20–30 поколениях синтетического автотетраплоида *Arabidopsis thaliana* обнаружена транслокация 45S между 4 и 3 хромосомами [116].

Метилирование ДНК и полиморфизм по отдельным нуклеотидам (SNP-полиморфизм)

Одним из механизмов скачкообразного изменения генома у сформировавшихся полиплоидов может быть изменение паттернов генов вследствие ДНК-метилирования. Такое предположе-

ние было выдвинуто после проведения ПДРФ-анализа на пшенице [117] и капусте [118] с использованием изошизомеров (рестрикционных эндонуклеаз), которые специфичны к определенным сайтам рестрикции, но очень чувствительны к уровню метилирования. В результате анализа получены некоторые специфические фрагменты, что связано с метилированием ДНК. Метилирование цитозина, особенно по CpG динуклеотидам и CpNpG тринуклеотидам, часто встречается в растениях и, как полагают, играет определенную роль в регуляции экспрессии генов, времени репликации ДНК и др. [119, 120]. Метилирование ДНК может также иметь огромное значение в защитной реакции растения к любой вирусной инфекции или к деятельности мобильных элементов [121–124]. Было предположено, что основной функцией метилирования ДНК может быть подавление активности мобильных элементов [124]. Такое предположение поддерживалось некоторыми авторами [125–127]. Как было отмечено в ряде работ [128–134], высокая частота «замолкания» введенных в растения трансгенов может быть обусловлена таким эпигенетическим механизмом, как ДНК-метилирование.

У многих модельных полиплоидов может наблюдаться либо потеря дублированных генов (элиминация), либо их специфическая инактивация за счет метилирования. Как указывалось выше, эпигенетический сайленсинг может защищать дублированные гены от превращения их в псевдогены и способствовать тем самым приобретению ими новых функций [105].

Метилирование ДНК может играть значительную роль в эволюционной динамике дублированных генов [135]. Этот эпигенетический механизм может оказывать потенциальное влияние на фенотип растения и является своего рода ответной реакцией на изменение условий окружающей среды, а также геномные стрессы, такие как гибридизация и полиплоидизация [136]. Метилирование ДНК является эпигенетическим регуляторным процессом экспрессии генов, который встречается у вновь синтезированных полиплоидных видов и обусловлен дубликацией генома [137]. Например, быстрые эпигенетические изменения обнаружены у полиплоида *Spartina anglica*, у которого 30% генов были метилированы вследствие полиплоидизации генома [138]. У синтетических

гексаплоидов пшеницы метилирование цитозина наблюдается уже в ранних поколениях после полиплоидизации (F_{5-7}) [40]. В первом поколении триплоидных растений одуванчика, полученных бесполом размножением, обнаружено незначительное изменение уровня метилирования ДНК по сравнению с F_0 . Это говорит о том, что метилирование ДНК произошло вследствие образования триплоида [136].

Следовательно, такие механизмы, как мутационные процессы, активация мобильных генетических элементов, эпигенетические модификации (ДНК-метилирование), происходящие при полиплоидизации, могут вызывать изменение экспрессии дублированных генов.

Полиморфизм по отдельным нуклеотидам (SNP) широко распространен в геномах растений и является незаменимым в ассоциативном картировании и построении генетических карт высокого разрешения [139]. При SNP-анализе полиплоидных геномов результаты в большинстве случаев получаются неоднозначными. Е. Akhunov et al. [140] изучили SNP у 91 гомозиготной полиплоидной линии пшеницы, включая 53 тетраплоида и 38 гексаплоидов с помощью анализа Illumina Golden Gate. Анализ выявил, что 89 и 84% SNP у тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы соответственно являются уникальными. Р. Bundock et al. провели SNP-анализ гетерозиготного полиплоида сахарного тростника [141]. Они секвенировали 307 ампликонов, полученных с помощью ПЦР (59 kb), и генерировали 182,996 секвенированных ридов со средней глубиной секвенирования ~300 и средней длиной рида 220 оснований. Анализ данных секвенирования выявил 1 замену на 58 оснований в среднем у каждого полиплоидного растения сахарного тростника.

Заключение

Исходя из всего вышеизложенного [1–141], полиплоидия — больше, чем простое удвоение генома. Она включает целый ряд таких молекулярно-генетических процессов, как:

- дифференциальная элиминация ДНК дублированного генома;
- диверсификация — функциональное расхождение дублированной копии;
- консервация функции — сохранение прежней функции обеими копиями дублированных генов;

- псевдогенизация — утрата функциональной активности дубликата;
- эпигенетические модификации — ДНК-метилирование;
- активация мобильных генетических элементов;
- SNP-полиморфизм — изменение нуклеотидной последовательности.

Список использованных источников

1. Wendel, J. Genome evolution in polyploids / J. Wendel // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — Vol. 42, № 1. — P. 225–249.
2. Blanc, G. A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome / G. Blanc, K. Hokamp, K. Wolfe // *Genome Res.* — 2003. — Vol. 13, № 2. — P. 137–144.
3. Piskur, J. Origin of the duplicated regions in the yeast genomes / J. Piskur // *Trends Genet.* — 2001. — Vol. 17, № 6. — P. 302–303.
4. Kellis, M. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / M. Kellis, B. Birren, E. Lander // *Nature.* — 2004. — Vol. 428, № 6983. — P. 617–624.
5. Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploidy yeast / D. Scannell [et al.] // *Nature.* — 2006. — Vol. 440, № 7082. — P. 341–345.
6. Chen, C. Patterns of internal gene duplication in the course of metazoan evolution / C. Chen, W. Li, H. Sung // *Gene.* — 2007. — Vol. 396, № 1. — P. 59–65.
7. The gain and loss of genes during 600 million years of vertebrate evolution / T. Blomme [et al.] // *Genome Biol.* — 2006. — Vol. 7, № 5. — P. 43.
8. Levy, A. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization / A. Levy, M. Feldman // *Biol. J. Linn. Soc.* — 2004. — Vol. 82, iss. 4. — P. 607–613.
9. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids / T. Osborn [et al.] // *Trends Genet.* — 2003. — Vol. 19, № 3. — P. 141–147.
10. Liu, B. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids / B. Liu, J. Wendel // *Mol. Phylogenet. Evol.* — 2003. — Vol. 29, № 3. — P. 365–379.
11. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids / A. Madlung [et al.] // *Plant Physiol.* — 2002. — Vol. 129, № 2. — P. 733–746.
12. Rapid genomic changes in interspecific and intergeneric hybrids and allopolyploids of *Triticeae* / F. Han [et al.] // *Genome.* — 2003. — Vol. 46, № 4. — P. 716–723.
13. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (*Brassicaceae*) / J. Pires [et al.] // *Biol. J. Linn. Soc.* — 2004. — Vol. 82, iss. 4. — P. 675–688.
14. First nuclear DNA C-values for 25 angiosperm families / L. Hanson [et al.] // *Annals of Botany.* — 2001. — Vol. 87, iss. 2. — P. 251–258.
15. First nuclear DNA C-values for 28 angiosperm genera / L. Hanson [et al.] // *Annals of Botany.* — 2003. — Vol. 91, № 1. — P. 1–8.
16. Leitch, I. DNA C-values in seven families till phylogenetic gaps in the basal angiosperms / I. Leitch, L. Hanson // *Bot. J. Linn. Soc.* — 2002. — Vol. 140, iss. 2. — P. 175–179.
17. Comparisons with *Caenorhabditis* (-100Mb) and *Drosophila* (-175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be -157 Mb and thus -25% larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative estimate of ~125 Mb / M. Bennet [et al.] // *Annals of Botany.* — 2003. — Vol. 91, № 5. — P. 547–557.
18. Bennett, M. Chromosome evolution in polyploid plants / M. Bennett, L. Hanson, I. Leitch // *Cytogenetics and Cell Genetics.* — 1998. — Vol. 81, № 2. — P. 124.
19. Bennett, M. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses — 807 new estimates / M. Bennett, P. Bhandol, I. Leitch // *Annals of Botany.* — 2000. — Vol. 86, iss. 4. — P. 859–909.
20. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III / B. Bremer [et al.] // *Bot. J. Linn. Soc.* — 2009. — Vol. 161, iss. 2. — P. 105–121.
21. Wolfe, K. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome / K. Wolfe, D. Shields // *Nature.* — 1997. — Vol. 387, № 6634. — P. 708–713.
22. Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes / R. Langkjaer [et al.] // *Nature.* — 2003. — Vol. 421, № 6925. — P. 848–852.
23. Furlong, R. Were vertebrates octoploid? / R. Furlong, P. Holland // *Philosophical Trans-*

- actions of the Royal Society of London, Series B. — 2002. — Vol. 357, № 1420. — P. 531–544.
24. Vision, T. The origins of genomic duplications in *Arabidopsis* / T. Vision, D. Brown, S. Tanksley // Science. — 2000. — Vol. 290, № 5499. — P. 2114–2117.
25. The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana* / C. Simillion [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. — 2002. — Vol. 99, № 21. — P. 13627–13632.
26. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events / J. Bowers [et al.] // Nature. — 2003. — Vol. 422, № 6930. — P. 433–438.
27. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids / T. Osborn [et al.] // Trends Genet. — 2003. — Vol. 19, № 3. — P. 141–147.
28. Phenotypic, genetic and genomic consequences of natural and synthetic polyploidization of *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana obtusifolia* / S. Anssour [et al.] // Annals of Botany. — 2009. — Vol. 103, № 8. — P. 1207–1217.
29. Sequence composition and genome organization of maize / J. Messing [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004. — Vol. 101, № 40. — P. 14349–14354.
30. Gene loss and movement in the maize genome / J. Lai [et al.] // Genome Res. — 2004. — Vol. 14, № 10A. — P. 1924–1931.
31. Comparing sequenced segments of the tomato and *Arabidopsis* genomes: large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny / H. Ku [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. — 2000. — Vol. 97, № 16. — P. 9121–9126.
32. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat / H. Shaked [et al.] // Plant Cell. — 2001. — Vol. 13, № 8. — P. 1749–1759.
33. Ozkan, H. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) / H. Ozkan, A.A. Levy, M. Feldman // Plant Cell. — 2001. — Vol. 13, № 8. — P. 1735–1747.
34. Ozkan, H. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat *Aegilops-Triticum* group / H. Ozkan, M. Tuna, K. Arumuganathan // Journal of Heredity. — 2003. — Vol. 94, № 3. — P. 260–264.
35. Associated chromosomal DNA changes in polyploids / S. Raina [et al.] // Genome. — 1994. — Vol. 37, № 4. — P. 560–564.
36. Genome size in natural and synthetic autopolyploids and in natural segmental allopolyploid of several *Triticeae* species / T. Eilam [et al.] // Genome. — 2009. — Vol. 52, № 3. — P. 275–285.
37. Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp. / L. Martelotto [et al.] // Plant Science. — 2007. — Vol. 172, iss. 5. — P. 970–977.
38. Parisod, C. Evolutionary consequences of autopolyploidy / C. Parisod, R. Holderegger, C. Brochmann // New Phytologist. — 2010. — Vol. 186, № 1. — P. 5–17.
39. Rivero-Guerra, A. Cytogenetics, geographical distribution, and pollen fertility of diploid and tetraploid cytotypes of *Santolina pectinata* Lag. (*Asteraceae: Anthemideae*) / A. Rivero-Guerra // Bot. J. Linn. Soc. — 2008. — Vol. 156, iss. 4. — P. 657–667.
40. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes / B. Liu [et al.] // Genome. — 2001. — Vol. 44, № 3. — P. 321–330.
41. Adams, K. Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton / K. Adams, J. Wendel // Biol. J. Linn. Soc. — 2004. — Vol. 82, iss. 4. — P. 573–581.
42. Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (*Poaceae*) / A. Baumel [et al.] // Molecular Biology and Evolution. — 2002. — Vol. 19, № 8. — P. 1218–1227.
43. Ainouche, M. *Spartina anglica* C. Hubbard: a natural model system for studying early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes / M. Ainouche, A. Baumel, A. Salmon // Biol. J. Linn. Soc. — 2004. — Vol. 82, iss. 4. — P. 475–484.
44. Gustafson, J. The effect of telomeric heterochromatin from *Secale cereale* on *Triticale* (x *Triticosecale*). I. The influence of the loss of several blocks of telomeric heterochromatin on early endosperm development and kernel characteristics at maturity / J. Gustafson, M. Bennett // Canadian Journal of Genetics and Cytology. — 1982. — Vol. 24, № 1. — P. 83–92.
45. Bennett, M. Variation in genomic form in plants and its ecological implications / M. Bennett // New Phytologist. — 1987. — Vol. 106, iss. s1. — P. 177–200.
46. Bennetzen, J. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering

- plants / J. Bennetzen // *Genetica*. — 2002. — Vol. 115, № 1. — P. 29–36.
47. Feast and famine in plant genomes / J. Wendel [et al.] // *Genetica*. — 2002. — Vol. 115, iss. 1. — P. 37–47.
48. Devos, K. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis* / K. Devos, J. Brown, J. Bennetzen // *Genome Research*. — 2002. — Vol. 12, № 7. — P. 1075–1079.
49. Внутри- и межклеточные цитомиктические взаимодействия в микроспорогенезе одно- и двудольных растений / Е. А. Кравец [и др.] // *Цитология и генетика*. — 2016. — Т. 50, № 5. — С. 3–16.
50. Buttrill, D. Selection-mutation balance in polysomic tetraploids: Impact of double reduction and gametophytic selection on the frequency and subchromosomal localization of deleterious mutation / D. Buttrill, L. Boiteux // *PNAS*. — 2000. — Vol. 97, № 12. — P. 6608–6613.
51. Lynch, M. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes / M. Lynch, J. Conery // *Science*. — 2000. — Vol. 290, № 5494. — P. 1151–1155.
52. Lynch, M. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization / M. Lynch, A. Force // *Genetics*. — 2000. — Vol. 154, № 1. — P. 459–473.
53. Hahn, M. Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplicates / M. Hahn // *J. Hered.* — 2009. — Vol. 100, № 5. — P. 605–617.
54. Ohno, S. Evolution by gene duplication / S. Ohno. — New York: Springer-Verlag, 1970. — 160 p.
55. Zhang, J. Adaptive evolution of a duplicated pancreatic ribonuclease gene in a leaf-eating monkey / J. Zhang, Y. Zhang, H. Rosenberg // *Nat. Genet.* — 2002. — Vol. 30, № 4. — P. 411–415.
56. Zhang, J. Parallel adaptive origins of digestive RNases in Asian and African leaf monkeys / J. Zhang // *Nat. Genet.* — 2006. — Vol. 38, № 7. — P. 819–823.
57. Adaptive evolution of digestive *RNASE 1* genes in leaf-eating monkeys revisited: new insights from ten additional colobins / L. Yu [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* — 2010. — Vol. 27, № 1. — P. 121–131.
58. Des Marais, D. Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene / D. Des Marais, M. Rausher // *Nature*. — 2008. — Vol. 454, № 7205. — P. 762–765.
59. Hittinger, C. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch / C. Hittinger, S. Carroll // *Nature*. — 2007. — Vol. 449, № 7163. — P. 677–681.
60. Blanc, G. Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution / G. Blanc, K. Wolfe // *Plant Cell*. — 2004. — Vol. 16, № 7. — P. 1679–1691.
61. Ohta, T. Multigene families and the evolution of complexity / T. Ohta // *J. Mol. Evol.* — 1991. — Vol. 33, № 1. — P. 34–41.
62. Ohta, T. Further examples of evolution by gene duplication revealed through DNA sequence comparisons / T. Ohta // *Genetics*. — 1994. — Vol. 138, № 4. — P. 1331–1337.
63. Evolution of the chalcone synthase gene family in the genus *Ipomoea* / M. Durbin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1995. — Vol. 92, № 8. — P. 3338–3342.
64. Nucleotide polymorphism in the chalcone synthase-A locus and evolution of the chalcone synthase multigene family of common morning glory *Ipomoea purpurea* / G. Huttley [et al.] // *Mol. Ecol.* — 1997. — Vol. 6, iss. 6. — P. 549–558.
65. Duplication and functional divergence in the chalcone synthase gene family of *Asteraceae*: evolution with substrate change and catalytic simplification / Y. Helariutta [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — Vol. 93, № 17. — 1996. — P. 9033–9038.
66. Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization / R. Stupar [et al.] // *Genetics*. — 2007. — Vol. 176, № 4. — P. 2055–2067.
67. Differential sensitivity of the *Arabidopsis thaliana* transcriptome and enhancers to the effects of genome doubling / D. Pignatta [et al.] // *New Phytol.* — 2010. — Vol. 186, № 1. — P. 194–206.
68. A genome-wide comparison of genes responsive to autopolyploidy in *Isatis indigotica* using *Arabidopsis thaliana* affymetrix genechips / B. Lu [et al.] // *Plant Molecular Biology Reporter*. — 2006. — Vol. 24, № 2. — P. 197–204.
69. A comprehensive analysis of gene expression alterations in a newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid / L. Martelotto [et al.] // *Plant Science*. — 2005. — Vol. 169, iss. 1. — P. 211–220.

70. Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids: transcriptional changes do not explain differential protein regulation / A. Marmagne [et al.] // *New Phytol.* — 2010. — Vol. 186, № 1. — P. 216–227.
71. Reams, A. Selection for gene clustering by tandem duplication / A. Reams, E. Neidle // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2004. — Vol. 58. — P. 119–142.
72. Andersson, D. Gene amplification and adaptive evolution in bacteria / D. Andersson, D. Hughes // *Annu. Rev. Genet.* — 2009. — Vol. 43. — P. 167–195.
73. Harms, C. Herbicide resistance due to amplification of a mutant acetohydroxyacid synthase gene / C. Harms, S. Armour, J. Di Maio // *Mol. Gen. Genet.* — 1992. — Vol. 233, iss. 3. — P. 427–435.
74. Hurles, M. Gene duplication: the genomic trade in spare parts / M. Hurles // *PLoS Biol.* — 2004. — Vol. 2, № 7. — P. 206.
75. Extent of gene duplication in the genomes of *Drosophila*, nematode, and yeast / Z. Gu [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* — 2002. — Vol. 19, № 3. — P. 256–262.
76. Seoighe, C. Yeast genome evolution in the post-genome era / C. Seoighe, K. Wolfe // *Curr. Opin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 2, № 5. — P. 548–554.
77. Seoighe, C. Genome duplication led to highly selective expansion of the *Arabidopsis thaliana* proteome / C. Seoighe, C. Gehring // *Trends Genet.* — 2004. — Vol. 20, № 10. — P. 461–464.
78. Taylor, J. Genome duplication, divergent resolution and speciation / J. Taylor, V. de Peer, A. Meyer // *Trends Genet.* — 2001. — Vol. 17, № 6. — P. 299–301.
79. Ohno, S. Ancient linkage groups and frozen accidents // *Nature.* — 1973. — Vol. 244, № 5414. — P. 259–262.
80. Gottlieb, L. Electrophoretic evidence and plant populations // *Prog. Phytochem.* — 1981. — Vol. 7. — P. 1–46.
81. Gottlieb, L. Conservation and duplication of isozymes in plants // *Science.* — 1982. — Vol. 216, № 4544. — P. 373–380.
82. Wilson, H. Loss of duplicate gene expression in tetraploid *Chenopodium* / H. Wilson, S. Barber, T. Walters // *Biochem. Syst. Ecol.* — 1983. — Vol. 11, № 1. — P. 7–13.
83. Soltis, D. Isozymes in plant biology / D. Soltis, P. Soltis. — London: Chapman and Hall. — 1989. — 268 p.
84. Roose, M. Genetic and biochemical consequences of polyploidy in *Tragopogon* / M. Roose, L. Gottlieb // *Evolution.* — 1976. — Vol. 30, № 4. — P. 818–830.
85. Hart, G. Determination of relationships in the tribe *Triticeae* by genetic and biochemical studies of enzymes / G. Hart // *Wheat and wheat improvement* / Amer. Soc. of Agronomy, Crop Science Soc. of America, Soil Science Soc. of America; ed.: E. Heyne. — 2nded. — Madison, 1987. — P. 199–214.
86. Hart, G. Genome analysis in the *Triticeae* using isozymes / G. Hart // *Methods of Genome Analysis in Plants* / The University of Michigan; ed.: P. Jauhar. — Boca Raton: CRC Press, 1996. — P. 195–209.
87. Ferris, S. Tetraploidy and the evolution of catostomid fishes / S. Ferris // *Evolutionary Genetics of Fishes* / Virginia Polytechnic Institute and State University; ed.: B. Turner. — New York: Plenum, 1984. — P. 55–93.
88. Hypomethylated sequences: characterization of the duplicate soybean genome / T. Zhu // *Mol. Gen. Genet.* — 1994. — Vol. 244, № 6. — P. 638–645.
89. Gastony, G. Gene silencing in a polyploidy homosporous fern: paleopolyploidy revisited / G. Gastony // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — Vol. 88, № 5. — 1991. — P. 1602–1605.
90. Feldman, M. Genetic and evolutionary aspects of allopolyploidy in wheat / G. Galili, A. Levy // *The Origin and Domestication of Cultivated Plants: First Edition* / ed.: C. Barigozzi. — Amsterdam: Elsevier, 1986. — P. 83–100.
91. Galili, G. Diploidization of endosperm protein genes in polyploidy wheats / G. Galili, M. Feldman // 6th International Wheat Genetics Symposium: Conference Publication, Kyoto, November 28–December 3, 1983 / Kyoto University; ed.: S. Sakamoto. — Kyoto: Marusen Co, 1983. — P. 1119–1123.
92. Dubcovsky, J. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the *Triticeae* genomes / J. Dubcovsky, J. Dvorák // *Genetics.* — 1995. — Vol. 140, № 4. — P. 1367–1377.
93. Volkov, R. A. Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum* / N.V. Borisjuk, I.I. Panchuk, D. Schweizer, V. Hemleben // *Mol. Biol. Evol.* — 1999. — Vol. 16, № 3. — P. 311–320.
94. Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by

in situ hybridization / H. Thomas [et al.] // *Genome*. — 1997. — Vol. 40, № 3. — P. 406–410.

95. Snowdon, R. Chromosomal localization and characterization of rDNA loci in the *Brassica* A and C genomes / R. Snowdon, W. Köhler, A. Köhler // *Genome*. — 1997. — Vol. 40, № 4. — P. 582–587.

96. Shi, L. Ribosomal RNA genes in soybean and common bean: chromosomal organization, expression, and evolution / L. Shi, T. Zhu, P. Keim // *Theor. Appl. Genet.* — 1996. — Vol. 93, № 1–2. — P. 136–141.

97. Loss of nucleolus-organizer regions during polyploid evolution in *Scilla autumnalis* / H. Vaughan // *Heredity*. — 1993. — Vol. 71, № 6. — P. 574–580.

98. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing / K. Adams [et al.] // *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100, № 8. — P. 4649–4654.

99. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploid crop species / S. Mudge [et al.] // *Planta*. — 2009. — Vol. 229, № 3. — P. 549–558.

100. Frequent silencing of rDNA loci on the univalent-forming genomes contrasts with their stable expression on the bivalent-forming genomes in polyploid dogroses (*Rosa sect. Caninae*) / L. Khaitova [et al.] // *Heredity*. — 2010. — Vol. 104, № 1. — P. 113–120.

101. Gottlieb, L. A recently silenced duplicate PgiC locus in *Clarkia* / L. Gottlieb V. Ford // *Mol. Biol. Evol.* — 1997. — Vol. 14, № 2. — P. 125–132.

102. Pichersky, E. Defective chlorophyll a/b-binding protein genes in the genome of a homosporous fern / E. Pichersky, D. Soltis, P. Soltis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1990. — Vol. 87, № 1. — P. 195–199.

103. Korneev, S. Neuronal expression of neural nitric oxide (*nNOS*) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an *NOS* pseudogene / S. Korneev, J. Park, M. O'Shea // *J. Neurosci.* — 1999. — Vol. 19, № 18. — P. 7711–7720.

104. Hawkins, P. Transcriptional regulation of *Oct4* by a long non-coding RNA antisense to *Oct4*-pseudogene 5 / P. Hawkins, K. Morris // *Transcription*. — 2010. — Vol. 1, № 3. — P. 165–175.

105. Rodin, S. Epigenetic silencing may and evolution by gene duplication / S. Robin, A. Riggs // *J. Mol. Evol.* — 2003. — Vol. 56, № 6. — P. 718–729.

106. Grandbastien, M. *Tnt1*, amobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics / M. Grandbastien, A. Spielmann, M. Caboche // *Nature*. — 1989. — Vol. 337, № 6205. — P. 376–380.

107. Marillonnet, S. Retrotransposon insertion into the maize waxy gene results in tissue-specific RNA processing / S. Marillonnet, S. Wessler // *Plant Cell*. — 1997. — Vol. 9, № 6. — P. 967–978.

108. May, B. Transposon sequences drive tissue-specific expression of the maize regulatory gene *R-s* / B. May, S. Dellaporta // *Plant J.* — Vol. 13, № 2. — 1998. — P. 241–247.

109. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids / A. Madlung [et al.] // *Plant J.* — 2005. — Vol. 41, № 2. — P. 221–230.

110. Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina* / C. Parisod [et al.] // *New Phytol.* — 2009. — Vol. 184, № 4. — P. 1003–1015.

111. Mobilization of retrotransposons in synthetic allotetraploid tobacco / M. Petit [et al.] // *New Phytol.* — 2010. — Vol. 186, № 1. — P. 135–147.

112. Sarilar, V. Allopolyploidy has a moderate impact on restructuring at three contrasting transposable element insertion sites in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids / V. Sarilar, P. Palacios, A. Rousselet // *New Phytol.* — 2013. — Vol. 198, № 2. — P. 593–604.

113. Kashkush, K. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat / K. Kashkush, M. Feldman, A. Levy // *Nat. Genet.* — 2003. — Vol. 33, № 1. — P. 102–106.

114. Beaulieu, J. The allotetraploid *Arabidopsis thaliana* — *Arabidopsis lyrata* subsp. *petrae* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants / J. Beaulieu, M. Jean, F. Belzile // *Mol. Genet. Genomics*. — 2009. — Vol. 281, № 4. — P. 421–435.

115. Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto- and allopolyploid taxa of *Hepatica* (*Ranunculaceae*) / H. Weiss-Schneeweiss [et al.] // *New Phytol.* — 2007. — Vol. 174, № 3. — P. 669–682.

116. Weiss, H. Chromosomal rearrangement in autotetraploid plants of *Arabidopsis thaliana* / H. Weiss, J. Maluszynska // *Hereditas*. — 2000. — Vol. 133, № 3. — P. 255–261.
117. Liu, B. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy coding DNA sequences / B. Liu, J. Vega, M. Feldman // *Genome*. — 1998. — Vol. 41, № 4. — P. 535–542.
118. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution / K. Song [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1995. — Vol. 92, № 17. — P. 7719–7723.
119. DNA methylation in plants / E. Finnegan [et al.] // *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1998. — Vol. 49. — P. 223–247.
120. Richards, E. DNA methylation and plant development / E. Richards // *Trends Genet.* — 1997. — Vol. 13, iss. 8. — P. 319–323.
121. Flavell, R. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence activation / R. Flavell // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1994. — Vol. 91, № 9. — P. 3490–3496.
122. Matzke, A. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes / A. Matzke, M. Matzke // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 1998. — Vol. 1, № 2. — P. 142–148.
123. Matzke, M. Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defense responses / M. Matzke, A. Matzke // *Cell. Mol. Life Sci.* — 1998. — Vol. 54, iss. 1. — P. 94–103.
124. Yoder, J. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites / J. Yoder, C. Walsh, T. Bestor // *Trends Genet.* — 1997. — Vol. 13, № 8. — P. 335–340.
125. Bennetzen, J. The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution / J. Bennetzen // *Trends Microbiol.* — 1996. — Vol. 4, iss. 9. — P. 347–353.
126. Bennetzen, J. The structure and evolution of angiosperm nuclear genomes / J. Bennetzen // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 1998. — Vol. 1, iss. 2. — P. 103–108.
127. Bureau, T. A computer-based systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes / T. Bureau, P. Ronald, S. Wessler // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1996. — Vol. 93, № 16. — P. 8524–8529.
128. Holliday, R. Evidence for gene silencing by endogenous DNA methylation / R. Holliday, T. Ho // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1998. — Vol. 95, № 15. — P. 8727–8732.
129. Matzke, M. Paramutation and transgene silencing: a common response to invasive DNA? / M. Matzke, A. Matzke, W. Eggleston // *Trends Plant Sci.* — 1996. — Vol. 1, iss. 11. — P. 382–388.
130. Meyer, P. Homology-dependent gene silencing in plants / P. Meyer, H. Saedler // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1996. — Vol. 47. — P. 23–48.
131. Structural instability of a transgene locus in tobacco is associated with aneuploidy / I. Papp [et al.] // *Plant J.* — 1996. — Vol. 10, № 3. — P. 469–478.
132. A change in ploidy can modify epigenetic silencing / O. Scheid [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1996. — Vol. 93, № 14. — P. 7114–7119.
133. Stam, M. The silence of genes in transgenic plants / M. Stam, N. Mol, J. Kooter // *Ann. Bot.* — 1997. — Vol. 79, iss. 1. — P. 3–12.
134. Журавлева, Г. А. Возникновение новых белков за счет дупликации генов — что общего в эволюции зрительных и обонятельных белков и факторов терминации трансляции / Г. А. Журавлева, С. Г. Инге-Вечтомов // *Молекулярная биология*. — 2009. — Т. 43, № 5. — С. 759–771.
135. Yang, X. Divergence of the *Dof* gene families in poplar, *Arabidopsis*, and rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication / X. Yang, G. Tuskan, Z. Cheng // *Plant Physiol.* — 2006. — Vol. 142, № 3. — P. 820–830.
136. Verhoeven, K. Changes in genomic methylation patterns during the formation of triploid asexual dandelion lineages / K. Verhoeven, P. Van Dijk, A. Biere // *Mol. Ecol.* — 2010. — Vol. 19, № 2. — P. 315–324.
137. Salmon, A. Polyploidy and DNA methylation: new tools available / A. Salmon, M. L. Ainouche // *Mol. Ecol.* — 2010. — Vol. 19, № 2. — P. 213–215.
138. Salmon, A. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (*Poaceae*) / A. Salmon, M. Ainouche, J. Wendel // *Mol. Ecol.* — 2005. — Vol. 14, № 4. — P. 1163–1175.
139. Genomic aspects of research involving polyploid plants / X. Yang [et al.] // *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* — Vol. 104, iss. 3. — 2011. — P. 387–397.

140. Akhunov, E. Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay / E. Akhunov, C. Nicolet, J. Dvorak // Theor. Appl. Genet. — 2009. — Vol. 119, № 3. — P. 507–517.

141. Targeted single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in a highly polyploidy plant species using 454 sequencing / P. Bundock [et al.] // Plant Biotechnol. J. — 2009. — Vol. 7, № 4. — P. 347–354.

I.S. Gordej, O.M. Lyusikow, I.A. Gordej

MOLECULAR AND GENETIC CHANGES IN PLANTS AS A RESULT POLYLIPOIDIZATION (Review Article)

Institute of Genetics and Cytology of NASB
Minsk, 220072, the Republic of Belarus
e-mail: I_Gordej777@mail.ru

The article presents a review of the current literature on molecular-genetic changes in the plant genome as a result of polyploidization. Such aspects as the elimination of a part of nuclear DNA, the activation of mobile elements, the change in the level of DNA methylation, polymorphism by individual nucleotides, functional diversification, change in expression and the “silencing” of duplicated genes in polyploid plants are considered. These changes in the genetic mechanism cause a hereditary variety of botanical-morphological, anatomical, cytological, physiological, biochemical and other characteristics and features in plants, which ultimately creates a rich and diverse source material for expanding the gene pool and selecting new varieties.

Key words: polyploidy, polymorphism, genome, molecular analysis, DNA, duplication, expression.

Дата поступления статьи: 30 января 2019 г.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи должны быть написаны в сжатой и ясной форме и содержать:

- соответствующий индекс универсальной десятичной классификации литературы (УДК);
- название на русском и английском языках;
- инициалы и фамилии авторов на русском и английском языках;
- полное название учреждений, в которых выполнялось исследование и их почтовые адреса;
- ключевые слова (3–5 слов) на русском и английском языках;
- аннотацию на русском и английском языках (рекомендуемый средний объем аннотации — 500 знаков с пробелами). Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи;
- текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки «Введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение»), обзорная статья может содержать подзаголовки: «Введение», «Заключение» и названия подразделов;
- список использованных источников;
- дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10–12 страниц. После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентичного содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на флеш-накопителе) и на бумажном носителе в 2 экз. В виде отдельного документа представляются краткие сведения о каждом из авторов, включающие фамилию, имя, отчество, год рождения, сведения об образовании, служебные адреса, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность, область научных интересов.

Рукописи авторства сторонних организаций предоставляются вместе с сопроводительным письмом, в структуре которого должны содержаться сведения о том, что:

- рукопись не находится на рассмотрении в другом издании;
- не была ранее опубликована;
- автор (авторы) несут ответственность за достоверность представленных в рукописи материалов.

Также необходимо представить акт экспертизы о возможности опубликования в открытой печати. Научная статья должна иметь 2 рецензии от специалистов, имеющих ученую степень доктора или кандидата наук.

1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS Word. Название файлов — фамилия первого автора латинскими буквами.
2. Формат бумаги A4 (297 × 210 мм), ориентация — книжная.
3. Поля: верхнее — 2,5 см, нижнее — 2,5 см, левое — 2,5 см, правое — 2,5 см.
4. Основной текст статьи набирается шрифтом Times New Roman, размером 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.
5. Автоматическая расстановка переносов обязательна. Запрещается ручная расстановка принудительных переносов.
6. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.
7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).

8. Вставка в текст символов (например, β , ϵ) производится только через опцию «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C^2 , C_4) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются курсивом. Математические формулы ($\lim$, $\sum$, $\sin$, и т. д.) и цифры набираются прямым начертанием.
9. Сложные слова набираются через дефис (минерал-индикатор, К-пространство). Тире отбиваются с обеих сторон неразрывным пробелом как знак препинания между словами: система «человек – машина», «май – июнь». Тире между цифрами, напр., 20–30 чел. — не отбивается.
10. Кавычки по всему тексту должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбиваются от заключенных в них слов.
11. При подготовке к печати графиков, блок-схем, диаграмм, файлы должны быть названы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и какими по порядку рисунками статьи являются. Графики должны иметь толщину всех линий не менее 0,2 пункта для четкого воспроизведения. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, не допускается использование сканированного текста.
12. Фотоматериалы предоставляются в виде отдельных электронных файлов, также необходимы распечатки на лазерном принтере всех иллюстраций на листе формата А4. Отсканированные фотоиллюстрации серой, черно-белой цветовой модели должны иметь разрешение 600 dpi и формат TIFF.
13. Список цитированных источников располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок должны быть написаны внутри квадратных скобок (напр.: [1]).



НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ



Институт генетики и цитологии НАН Беларуси - ведущее научное учреждение в стране в области генетики, геномики и биотехнологии.

В структуре института функционирует Республиканский Центр геномных биотехнологий, Национальный координационный центр биобезопасности, Национальный координационный центр по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод.

Направления деятельности Института:

- изучение структурно- функциональной организации и изменчивости геномов растений, животных, микроорганизмов и человека.
- исследование генетических процессов регуляции жизнедеятельности живых организмов.
- разработка проблем генетической и клеточной инженерии.
- создание эффективных ДНК-технологий для сельского хозяйства, здравоохранения, спорта и охраны окружающей среды.
- изучение проблем биобезопасности.

Аккредитован в качестве научной организации. Сертифицирован на соответствие системы менеджмента качества требованиям стандарта СТБ ISO 9001-2015. Аккредитован на соответствие требованиям СТБ ИСО/МЭК 17025. Лицензия Минздрава. Сертификат Референсного Института Биоаналитики, Бонн, Германия.

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГЕНОМНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

Маркер-сопутствующая селекция.

ДНК-паспортизация сельскохозяйственных растений



тел. (+375 17) 294-91-80

Выявление генетически модифицированных ингредиентов (ГМИ).

Видовая идентификация мяса



тел. (+375 44) 784-16-91

Маркер-сопутствующая селекция

ДНК-паспортизация сельскохозяйственных животных, рыб



тел. (+375 29) 606-61-65

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЛАБОРТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

- | | |
|---------------------------------------|--|
| γ Сердечно-сосудистые заболевания | γ Наследственный гемохроматоз |
| γ Венозные тромбозы | γ Синдром Жильбера |
| γ Диабет 2-го типа | γ Диагностика генетических причин мужского бесплодия |
| γ Остеопороз | γ Переносимость алкоголя |
| γ Невынашивание беременности | γ Непереносимость глютена |
| γ Устойчивость к физическим нагрузкам | γ Лактазная недостаточность |
| γ Спортивная профилизация | γ Наследственная тугоухость |
| γ Фармакогенетика | γ Митохондриальные синдромы |
| γ Метаболический синдром | |

<http://www.genpassport.igc.by>
тел. (+375 17) 385-97-39, (+375 33) 380-50-40

<http://www.igc.by>
тел. (+375 33) 622-17-88

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ ДНК

ЦКП «ГЕНОМ»
тел. (+375 17) 332-16-13

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ БАНК ДНК ЧЕЛОВЕКА, ЖИВОТНЫХ, РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ

тел. (+375 17) 284-19-18

Национальный координационный центр по вопросам доступа к генетическим ресурсам и совместного использования выгод
тел. (+375 17) 399-85-75
www.abs.igc.by
belarusnpabs@gmail.com

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси
220072, РБ, г. Минск, ул. Академическая, 27.
Тел. (+375 17) 284-18-56 (приёмная),
(+375 17) 284-04-11 (отдел научной и инновационной работы). Факс (+375 17) 284-19-17
www.igc.by; office@igc.by

Национальный координационный центр биобезопасности
тел. (+375 17) 284-02-97,
www.biosafety.org.by



Образование

С целью привлечения талантливой молодежи и повышения эффективности подготовки научных кадров высшей квалификации в Институте созданы и функционируют 4 филиала кафедр:

- сельскохозяйственной биотехнологии и экологии Белорусской государственной сельскохозяйственной академии (руководитель – к.б.н., доцент Круглень Валентина Петровна);
- экологической и молекулярной генетики факультета экологической медицины Международного государственного экологического университета имени А.Д. Сахарова (заведующий филиалом кафедры – д.б.н., профессор, академик, Кильчевский Александр Владимирович);
- молекулярной биологии биологического факультета Белорусского государственного университета (ответственный – к.б.н., доцент Галиновский Дмитрий Валентинович);
- генетики биологического факультета Белорусского государственного университета (ответственный – к.б.н., доцент Лемеш Валентина Александровна).

В Институте действует система послевузовского образования:

- АСПИРАНТУРА (1-я ступень послевузовского образования) по специальностям:
03.02.07–генетика,
03.01.07–молекулярная генетика,
03.01.06–биотехнология (в том числе бионанотехнологии) (отрасль – Биологические науки).
Формы обучения: дневная (очная), заочная и соискательство.
- ДОКТОРАНТУРА (2-я ступень послевузовского образования) по специальности
03.02.07–генетика (отрасль – Биологические науки).
Формы обучения: дневная (очная) и соискательство.

Продолжительность обучения: 3 года, 4 года и 5 лет для дневной формы обучения, заочной формы обучения и соискательства соответственно.

По работе аспирантуры и докторантуры обращаться:

ученый секретарь Института, к.б.н. Надежда Ивановна Рябокөн
тел. +375 17 284 19 44, e-mail: U-Secretar@igc.by

старший научный сотрудник, к.б.н. Наталья Владимировна Анисимова
тел +375 17 284 19 11, e-mail: N.Anisimova@igc.by



ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 26

Ответственный за выпуск *А.Л. Богданова*
Переводчик *М.Г. Пыжова*

Подписано в печать 04.03.2019. Формат 60×84^{1/8}. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 20,93. Уч.-изд. л. 12,45. Тираж 100 экз. Заказ № 230.

Отпечатано в типографии «Акварель Принт» ООО «Промкомплекс».
Лицензия на полиграфическую деятельность № 02330/78 от 03.03.2014.
220070, г. Минск, ул. Радиальная, 40-202.

Оригинал-макет подготовлен в Государственном научном учреждении
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/51 от 08.10.2013.
220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.