

ISSN 1999-9127

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

# **МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА**

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ  
ТОМ 34**

Издается с 2005 года  
Выходит два раза в год

Минск  
2023

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, 2023. – Т. 34. – 144 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;  
О. Ю. Баранов, К. У. Вильчук, С. И. Гриб, Е. В. Гузенко, Н. И. Дубовец,  
А. Н. Евтушенков, А. П. Ермишин, А. И. Ковалевич, С. А. Красный, В. А. Лемеш,  
С. А. Лихачёв, Н. П. Максимова, М. Е. Михайлова, П. М. Морозик, И. Б. Моссэ,  
М. Е. Никифоров, В. Е. Падутов, Ф. И. Привалов, В. Н. Решетников, В. В. Титок,  
И. П. Шейко, Р. И. Шейко — члены редколлегии;  
Е. М. Селихова — ответственный секретарь.

УДК [577.21+575] (082)  
ISSN 1999-9127

## СОДЕРЖАНИЕ

О. Г. Бабак, Е. В. Дрозд, Н. А. Некрашевич, Н. В. Анисимова, К. К. Яцевич, А. В. Кильчевский Новый аллель гена <i>Golden 2-like</i> , его фенотипическое проявление и селекционное значение у <i>Solanum lycopersicum</i> .....	6
О. А. Орловская, С. И. Вакула, Л. В. Хотылёва, А. В. Кильчевский Аминокислотный состав зерна линий мягкой пшеницы с интрогрессиями генетического материала видов рода <i>Triticum</i> .....	17
Е. В. Лагуновская Оценка гомозиготности и аллельного состава генов, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками, у линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале .....	28
Е. Л. Романишко, М. Е. Михайлова, А. И. Киреева, Р. И. Шейко Альфа-маннозидоз — генетический дефект в белорусской популяции абердин-ангусского крупного рогатого скота .....	41
В. А. Лемеш, В. Ю. Агеец, А. И. Царь, М. С. Парфенчик, В. Н. Кипень, Т. А. Сергеева Генетическое разнообразие племенного ремонтно-маточного стада амурского сазана <i>Suiprinus carpio haematopterus</i> , выращиваемого в аквакультуре в Беларуси.....	49
Е. В. Гузенко Популяционно-генетические характеристики пчелосемей <i>Apis mellifera</i> L., разводимых на пасеках Минской области Республики Беларусь .....	60
И. Н. Андреева, Е. П. Михаленко, Е. И. Кузьминова, О. М. Малышева, А. В. Байда, Н. Б. Кузнецова, А. В. Кильчевский Интегративная оценка параметров липидного обмена и полиморфных вариантов гена <i>CYP19A1</i> у жителей Беларуси старшей возрастной группы .....	76
Ю. С. Станкевич, Е. П. Михаленко, А. Н. Щаюк, Е. И. Кузьминова, М. Н. Шепетько, Д. В. Лапицкий, А. В. Кильчевский Генетический полиморфизм ферментов антиоксидантной защиты у пациентов с раком легкого и хронической обструктивной болезнью легких .....	87
О. Д. Левданский, Р. С. Шулинский, Е. А. Мишук Возможности применения CNV анализа для поиска потенциальных маркеров предрасположенности к наследственным заболеваниям.....	96
К. Ю. Песоцкая, А. Л. Лагоненко, А. Н. Евтушенко Влияние делеции гена <i>OhrR</i> на продукцию факторов вирулентности фитопатогенными бактериями <i>Erwinia amylovora</i> .....	109
И. М. Голоенко, В. Г. Обьедков, Т. С. Голубева, Т. В. Докукина, А. В. Ходжаев Актуальность фармакогенетического тестирования при антипсихотической терапии шизофрении.....	121

Профессия — ученый (к юбилею академика Л. В. Хотылёвой) ..... 133

## CONTENTS

<i>O. G. Babak, E. V. Drozd, N. A. Nekrashevich, N. V. Anisimova, K. K. Yatsevich, A. V. Kilchevsky</i> New allele of the <i>Golden 2-like</i> gene, its phenotypic manifestation and breeding significance in <i>Solanum lycopersicum</i> .....	6
<i>O. A. Orlovskaya, S. I. Vakula, L. V. Khotyleva, A. V. Kilchevsky</i> Amino acid composition of the grain of common wheat lines with introgressions of the genetic material of <i>Triticum</i> species .....	17
<i>E. V. Lagunovskaya</i> Evaluation of homozygosity and the allelic composition of genes associated with economically valuable traits in doubled haploid wheat and triticale lines .....	28
<i>E. L. Ramanishka, M. E. Mikhailova, A. I. Kireyeva, R. I. Sheiko</i> Alfa-mannosidosis — a genetic defect in the belarusian Aberdeen Angus cattle population .....	41
<i>V. A. Lemesh, V. Yu. Ageyets, N. I. Tsar, M. S. Parfenchyk, V. N. Kipen, T. A. Sergeeva</i> Genetic diversity of the Amur sazan <i>Cyprinus carpio haematopterus</i> broodstock grown in the aquaculture of Belarus .....	49
<i>E. V. Guzenko</i> Population and genetic characteristics of bee colonies <i>Apis mellifera</i> L. bred in the apiaries of Minsk region of the Republic of Belarus .....	60
<i>I. N. Andreeva, E. P. Mikhalenka, E. I. Kuzminova, O. M. Malysheva, A. V. Bayda, N. B. Kuznetsova, A. V. Kilchevsky</i> Integrative assessment of lipid metabolism parameters and <i>CYP19A1</i> gene polymorphic variants in the residents of Belarus belonging to the senior age group .....	76
<i>Y. S. Stankevich, E. P. Mikhalenka, A. N. Shchayuk, A. I. Kusminova, M. N. Shapetska, D. V. Lapitsky, A. V. Kilchevsky</i> Genetic polymorphism of antioxidant protection enzymes in patients with lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease.....	87
<i>A. D. Liaudanski, R. S. Shulinski, Y. A. Mishuk</i> Possible applications of CNV analysis to search for potential markers to a hereditary disease predisposition .....	96
<i>K. Yu. Pesotskaya, A. L. Lagonenko, A. N. Evtushenkov</i> Influence of the <i>OhrR</i> gene deletion on the production of virulence factors by the phytopathogenic bacteria <i>Erwinia amylovora</i> .....	109
<i>I. M. Halayenka, V. G. Obyedkov, T. S. Golubeva, T. V. Dokukina, A. V. Hodzhaev</i> Relevance of pharmacogenetic testing in the antipsychotic therapy of schizophrenia .....	121
Profession — scientist (for the anniversary of academician L. V. Khotyleva).....	133

О. Г. Бабак, Е. В. Дрозд, Н. А. Некрашевич, Н. В. Анисимова, К. К. Яцевич, А. В. Кильчевский

## НОВЫЙ АЛЛЕЛЬ ГЕНА *GOLDEN 2-LIKE*, ЕГО ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ И СЕЛЕКЦИОННОЕ ЗНАЧЕНИЕ У *SOLANUM LYCOPERSICUM*

Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: o.babak@igc.by

В результате исследования полиморфизма гена транскрипционного фактора *Golden 2-like* найден новый аллель *U-del52*. Установлено, что делеция в 52 п. н. (конец экзона 2 – начало интрона 2) в гене *U* ведет к выпадению экзона 2 из зрелой мРНК при ее сплайсинге и синтезу белковой последовательности без MYB-like SANT домена, что изменяет ответную реакцию растения на факторы окружающей среды, прежде всего на интенсивность солнечного света. Выявлено фенотипическое проявление данного аллеля: светло-зеленые плоды со слабым увеличением концентрации хлорофилла у плодоножки на стадии технической спелости, более равномерное распределение пигментов в плодах по сравнению с нормальным аллелем *U* гена *GLK2*. Разработан молекулярный SCAR маркер *U-del52* для выявления данного аллеля. Показана более высокая концентрация антоциана у плодоножки у форм с сочетанием аллелей *U* и *Ant1* и равномерное распределение по поверхности плода у образцов с аллелями *U-del52* и *Ant1*. Создан новый селекционный материал для более детального изучения взаимодействия аллелей при накоплении пигментов в плодах и селекции, направленной на улучшение качества плодов.

**Ключевые слова:** *Solanum lycopersicum*, полиморфизм гена *GLK2*, регуляция синтеза пигментов, ДНК маркеры.

### Введение

Ген *Golden 2-like* является одним из двух генов транскрипционного фактора GLK в растениях. На начальных этапах изучения GLK транскрипционных факторов их относили к MYB TF из-за наличия MYB ДНК-связывающего домена в составе. Однако последние исследования по сравнительному анализу последовательностей белков и генов позволили выделить отдельную филогенетическую группу — надсемейство GARP специфичных для растений факторов транскрипции [1–3]. Белки GLK составляют отдельную группу внутри надсемейства. В целом белки надсемейства GARP участвуют в восприятии сигналов окружающей среды (свет, уровень питательных элементов и др.) и регуляции развития хлоропластов, колебания циркадных часов, гормональной сигнализации [1–3]. Большинство GLK TF содержат два высококонсервативных домена: ДНК-связывающий домен MYB и С-концевой (GCT) бокс [3]. Данные белки прежде всего регулируют способность к све-

тостимулированию фотосинтеза путем контроля образования хлоропластов. Возможность генетической регуляции уровня фотосинтеза и накопления вторичных метаболитов путем изменения экспрессии и структуры генов GLK TF вызывает широкий интерес исследователей в различных странах и имеет важное практическое значение [2–8].

Синтез GLK белков определяется парой генов *GLK1* и *GLK2*, достаточно хорошо изученных у кукурузы, риса, арабидопсиса, овса, томата и других культур [2–5]. Также в литературе представлены данные об особенностях экспрессии *GLK1* и *GLK2* в тканях растений с С3 и С4 фотосинтетическими путями [6–8].

А. L. T. Powell и др. [9] идентифицировали гены *GLK1* и *GLK2* у томата и показали, что аллель *U* гена *SIGLK2* определяет накопление и распределение хлорофилла в развивающихся плодах и приводит к образованию плодов с темно-зеленым пятном у плодоножки. Авторы выяснили, что однонуклеотидная инсерция аденина (А) в первом экзоне гена *GLK2* тес-

но связана с другим известным фенотипом — *uniform ripening (u)*. Данная мутация приводит к сдвигу рамки считывания, образованию раннего стоп-кодона и, как следствие, синтезу нефункционального белка. Плоды с гомозиготным генотипом по аллелю *u* имеют однородную светло-зеленую окраску на этапе начала созревания, что может быть внешне привлекательным, однако накопление хлорофилла, каротиноидов и сахаров у форм с *u* аллелем меньше, чем с нормальным *U* аллелем.

С. V. Nguyen и др. [10] в своих работах показали, что гены *GLK1* и *GLK2* у томата кодируют функционально сходные пептиды, при этом дифференциальная экспрессия делает ген *GLK1* более важным в листьях, в то время как действие гена *GLK2* преобладает в плодах. Данные результаты показывают большую важность гена *GLK2* в селекции на улучшение качества плодов по сравнению с *GLK1*.

В ранее выполненных исследованиях на основе данных по полиморфизму гена *GLK2* [9] нами разработан SCAR маркер *u-7A*, позволяющий дифференцировать формы томата по наличию в них аллелей *u* или *U*. Других полиморфизмов данного гена в литературе не описано. ДНК-маркирование известных аллелей и фенотипическая оценка широкой коллекции форм томата по признаку накопления и распределения пигментов на стадии технической спелости выявила новые фенотипы, отличные от двух вышеописанных. В связи с чем целью нашей работы был поиск нового полиморфизма гена *GLK2* и оценка его значимости в селекции, направленной на улучшение качества плодов томата. Для этого были поставлены следующие задачи: оценить наблюдаемое фенотипическое проявление признака «накопление и распределение пигментов в плодах томата на стадии начала созревания плодов (на стадии технической спелости)»; выполнить ресиквенс гена *Golden 2-like* у форм *Solanum lycopersicum* с различным распределением пигментов (хлорофиллов и антоцианов) в плодах; оценить влияние выявленного генетического полиморфизма *GLK2* на структуру мРНК, аминокислотной последовательности, на фенотип плодов томата; подобрать праймеры для ДНК-типирования выявленных полиморфизмов и оценить возможность маркирования новых фенотипических проявлений

накопления и распределения пигментов в плодах на основе выявленных структурных изменений последовательности изучаемого гена.

## Материалы и методы

Объектами для исследований полиморфизма гена *GLK2* являлись константные формы с различным фенотипическим проявлением признака «накопление и распределение пигментов в плодах на стадии технической спелости», 8 диких видов (подвидов): *S. pimpinellifolium*, *S. humboldtii*, *S. glandulosum*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. cheesmanii*, *S. paviflorum*, *S. hirsutum*. Для изучения связи выявленных полиморфизмов гена *GLK2* с фенотипом, а также для изучения связи между аллельным составом гена и накоплением антоцианов использовались популяции  $F_2$  с различным составом аллелей генов *Anthocyanin1 (Ant1)* *Golden 2-like (GLK2)*: 157 образцов Индиго (*Ant1, U*) × Дачный (*ant1, U-del52*) и 79 образцов  $F_2$  Индиго (*Ant1, U*) × № 17-2020 (*ant1, u*).

Выделение ДНК проводили при помощи набора реагентов компании Праймтех из молодых верхушечных листьев растений томата согласно протоколу производителя. Количество ДНК в образце определяли на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro.

Нуклеотидные последовательности гена *GLK2* у образцов *S. lycopersicum* определяли путем секвенирования. Для этого фрагменты амплификации, полученные на геномной ДНК с подобранными геноспецифическими праймерами на основе последовательности участка хромосомы 10 томата (NC\_015447), где локализован ген *U* (табл. 1), были секвенированы с применением набора Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно методике производителя. Для дизайна праймеров использовали программу Primer-BLAST на сайте Центра биотехнологической информации NCBI [11]. Продукты секвенирующей реакции очищали спиртовым осаждением и растворяли в 20 мкл формамида, денатурировали нагреванием до 95 °С в течение 2 мин и далее проводили капиллярный электрофорез с использованием ДНК-секвенатора ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Компьютерную обработку данных, полученных в результате секвенирования, проводили в программе

Таблица 1

Праймеры для секвенирования гена *GLK2* у томата

Наименование праймера	Область секвенирования	Последовательность праймера, 5' → 3'	Температура отжига, °C	Размер ПЦР продукта, п. н.
U-F1/R1	5' UTR – экзон 1	TGATGTCACCAAATTCTTTCATCCT	60	1 168
		ACGACTAGAACCGTCAACGA		
U-F2/R2	Экзон 1 – экзон 2	TGTGAAGAACCTGCTATTCATGG	60	1 171
		TCCCAAATTGCAAAAATGGCGATA		
U-F3a/R3	Конец экзона 2 – экзон 4	GAGCTTATGGCAACTCATGGTC	60	1 172
		CGCTGATGTTATTGGCGCAG		
U-F4a/R4a	Конец экзона 4 – экзон 5	CTGCGCCAATAACATCAGCG	60	528
		CCGTTAGAGGAAAAGGGTATATGT		
U-F5/R5	Экзон 6	ACATATACCCTTTTCCTCTAACGG	60	1 185
		TGGGGGTATTTTGGTAATCCCTT		

Sequencing Analysis Software v 5.2 (Applied Biosystems).

Для оценки влияния выявленных полиморфизмов на структуру мРНК гена *GLK2* была выделена РНК гена с помощью набора Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience) и очищена ДНК-азой (Thermo Scientific), после чего синтезирована кДНК с использованием набора реактивов Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific) по инструкции производителя. На матрице кДНК исследуемых образцов с использованием ранее сконструированных праймеров U-F2/U-R3 к экзонным областям гена *GLK2* после проведения ПЦР были получены ампликоны, которые затем секвенировали. Построение аминокислотных последовательностей проводили с использованием программы Blast

на сайте Центра биотехнологической информации NCBI [11].

Для ДНК-типирования аллелей гена *Ant1* (*Ant1/ant1*) у образцов расщепляющихся популяций использовали CAPS маркер *Ant1-NcoI* [12], аллелей гена *GLK2* (*U/u*) — разработанный нами SCAR маркер *u-7A*.

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); 1,4 единицы Tornado DNA-полимеразы в инкубационном буфере «F» (Праймтех, Беларусь) и 0,25 пмоль/мл олигонуклеотидных праймеров (Праймтех, Беларусь). Режим ПЦР был следующим: 95 °C — 15 мин, затем следовало 35 циклов, состоящих из инкубаций: 99 °C — 1 сек,

55–60 °C — 30 сек и 72 °C — 1 мин. Реакцию завершали при 72 °C в течение 7 мин.

Продукты ПЦР реакции CAPS маркера Ant1-NcoI разделяли методом электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия и документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000. В качестве маркера молекулярного веса использовали 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific). Рестрикционная смесь объемом 20 мкл включала 1 мкл ампли-

кона, 2 мкл 10X-буфера, 16 мкл mQ, 1 мкл NcoI. Режим рестрикции — 16 ч при 37 °C. Продукты ПЦР с использованием SCAR маркера u-7A разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле с использованием ДНК-секвенатора ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Размер ампликонов определяли с использованием стандарта Liz500. Используемые праймеры и ожидаемые продукты представлены в таблице 2.

**Таблица 2**

Праймеры для ДНК-типирования аллелей генов *Ant1* и *GLK2*

Название маркера	Последовательность праймера, 5' → 3'	Температура отжига, °C	Размер ПЦР продукта, п. н.
CAPS маркер Ant1-NcoI [12]	GGAAGGACAGCTAACGATGTG-	55	478
	GTTGCATGGGTGGTAAATTAAG		
SCAR маркер u-7A	ACGGTGGAGATTTACTGCCA -FAM	60	221 / 222
	ACGACTAGAACCGTCAACGA		

Эффективность разработанных маркеров на основе выявленных новых структурных изменений гена *GLK2* оценивали по соответствию между наблюдаемыми и ожидаемыми по результатам ДНК-типирования фенотипами методом Хи-квадрат ( $\chi^2$ ), где общей мерой отклонения практических данных от теоретических, т. е. критерия соответствия  $\chi^2$ , является сумма отношений квадратов разностей между частотами практического  $f_n$  и теоретического  $F_n$  распределений к частотам теоретического  $F_n$  распределения для данной группы (формула 1) [13].

$$\chi^2 = \sum ((f_n - F_n)^2 / F_n) \quad (1)$$

### Результаты и обсуждения

Исследования по изучению полиморфизма гена *GLK2* были начаты с выявления известных аллелей *U* и *u* с использованием разработанного нами SCAR маркера u-7A (табл. 2) на широкой коллекции форм томата. Сопоставление результатов молекулярного анализа и фенотипической оценки признака «окраска плодов и характер распределения хлорофилла в них на стадии технической спелости»

выявило новые фенотипы, отличные от двух известных [9]. На основании полученных результатов выполнен ресиквенс гена *Golden 2-like* (Gene ID: 101055613) у форм *Solanum lycopersicum* с различным распределением хлорофиллов и антоцианов в плодах на стадии технической спелости. С помощью разработанных праймеров (табл. 1) была проведена амплификация с образцами томата Бурштын (*U*), Дзивосны (*U*), Патрикеевна (*u*), выполнен сиквенс полученных фрагментов и их выравнивание (рис. 1).

Сравнительный анализ полученных последовательностей показал идентичность гена *GLK2* у сорта Патрикеевна мутантному аллелю *u* (вставка аденина в первом экзоне гена). На основе секвенирования форм томата с различным характером распределения пигментов в генотипе образцов Бурштын и Дзивосны выявлен новый полиморфизм гена *GLK* по сравнению с нормальным аллелем *U* — 4 SNP (1 в экзонной и 3 в интронной области), 2 однонуклеотидные вставки (в интронной области), делеция размером 52 п. н., затрагивающая область конца второго экзона – начала второго интрона.

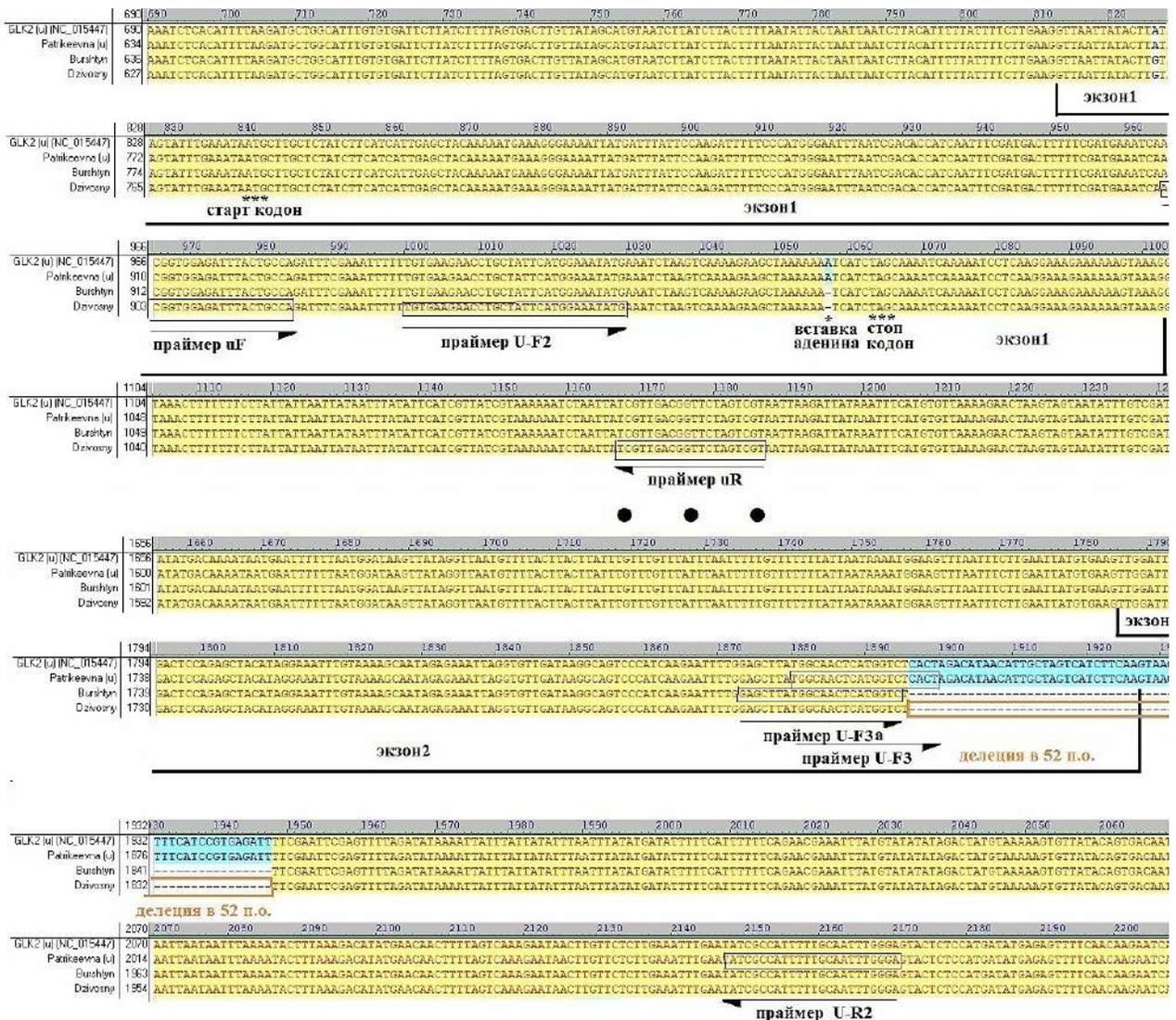


Рис. 1. Выравнивание последовательностей ДНК гена *GLK2* у образцов томата Бурштын, Дзивосны и Патрикеевна

Учитывая, что сорта Бурштын и Дзивосны имеют общее происхождение, выполнена амплификация ДНК родительских форм Дачный и Индиго с использованием пары праймеров U-F3а/U-R2, позволяющей выявить делецию размером 52 п. н. (рис. 2). Аллель с вновь выявленным генетическим полиморфизмом выявлен у сорта Дачный. ПЦР с использованной парой праймеров дал продукты размером в 298 п. н. (Индиго — аллель *U*) и 246 п. н. у образцов Дачный, Дзивосны.

Так как делеция размером 52 п. н. затрагивает область конца второго экзона – начала второго интрона (рис. 1), нами сделано предположение о ее влиянии на процесс сплайсинга мРНК. Для проверки данного предположения выделена РНК форм с различными полиморфизмами данного гена, синтезирована кДНК, выполнен

сиквенс последовательности (рис. 3А), получены ампликоны на кДНК с различными парами праймеров (рис. 3Б). Сравнительный анализ показал, что в отличие от контрольного сорта Индиго (контроль 95-1 рис. 3А) в зрелой мРНК

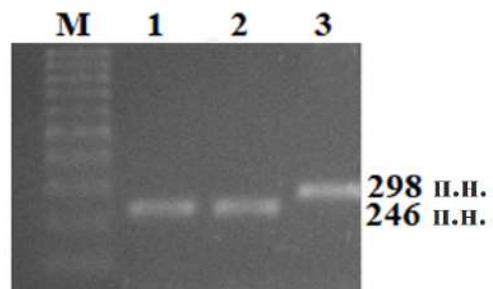
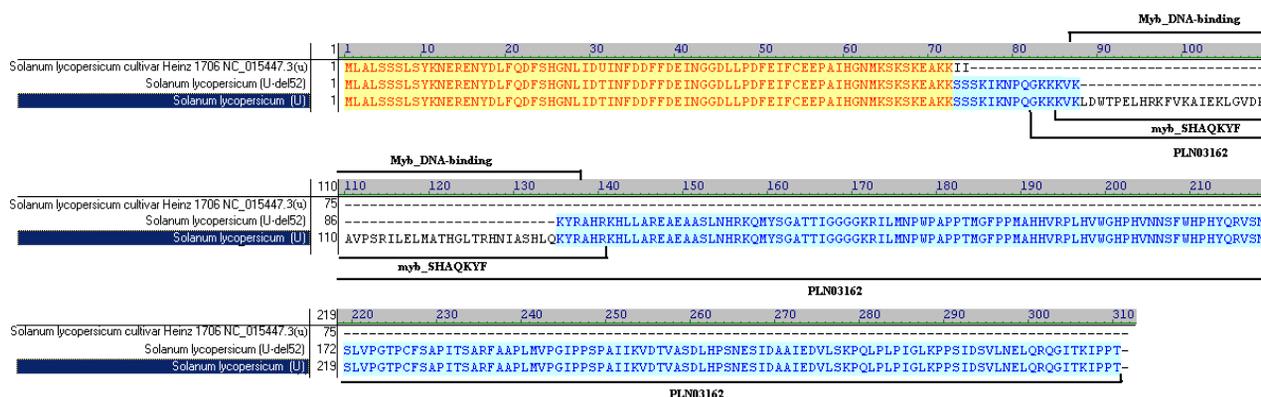


Рис. 2. Продукты амплификации образцов томата с парой праймеров U-F3а/U-R2. М — маркер молекулярного веса, 1 — Дачный, 2 — Дзивосны, 3 — Индиго





**Рис. 4.** Аминокислотные последовательности GLK ТФ и их регуляторные элементы: 82–310 — PLN03162 GLK2 ТФ; 85–140 — ДНК-связывающий домен класса SHAQKYF; 87–137 — Муб- подобный ДНК-связывающий SANT домен [11]

вающего домена из ТФ и изменением реакции растения на уровень солнечной радиации.

Для выявления нового аллеля разработан SCAR маркер *U-del52*, ограничивающий область гена парой праймеров *U-F3a/U-R2*, позволяющей выявить делецию 52 п. н. и, соответственно, аллель *U-del52*:

*U-F3a*: GAGCTTATGGCAACTCATGGTC

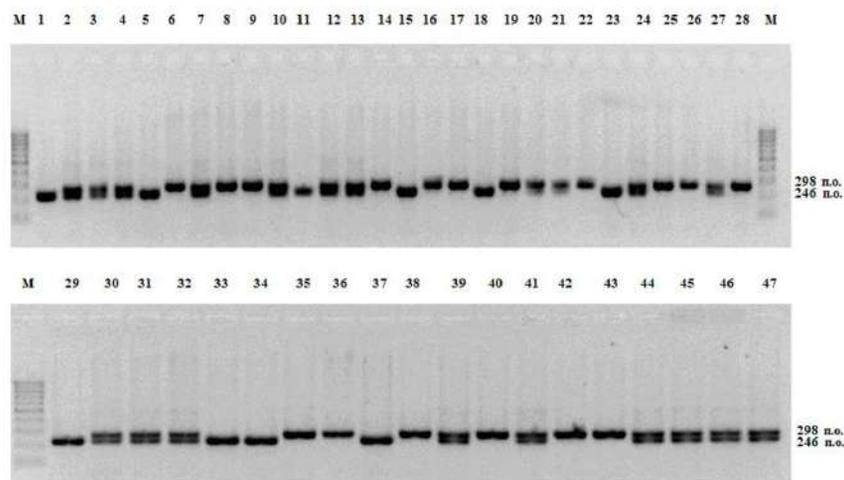
*U-R2*: TCCCAAATTGCAAAAATGGCGATA.

Проведен скрининг широкой коллекции *Solanum lycopersicum* и диких видов томата (более 100 форм различного происхождения). Данный аллель не обнаружен у диких родственных видов (*S. pimpinellifolium*, *S. humboldtii*, *S. glandulosum*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. cheesmanii*, *S. paviflorum*, *S. hirsutum*). У *Solanum lycopersicum* новый аллель *U-del52* выявлен у двух образцов кол-

лекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР): Желтый деликатес (вр.к.-15368) и Топ модель (вр.к.-17185).

Для изучения фенотипического проявления аллеля *U-del52* и подтверждения статистической достоверности эффективности разработанного маркера проведено ДНК-типирование 157 образцов популяции  $F_2$  гибрида Индиго (*U*, *Ant1*) × Дачный (аллель *U-del52*, *ant1*) с помощью маркера *U-del52* (рис. 5).

В результате сопоставления данных молекулярного маркирования и фенотипических описаний изучаемых форм, выполненных в 2022 г., установлено, что плоды форм с гомозиготным аллелем *U-del52* имели на стадии технической спелости светло-зеленую окраску со слабым увеличением concentra-



**Рис. 5.** ДНК-типирование образцов популяции  $F_2$  гибрида Индиго (*U*, *Ant1*) × Дачный (аллель *U-del52*, *ant1*) с помощью маркера *U-del52* (образцы 1–47)

ции хлорофилла у плодоножки (рис. 6А). Более равномерное распределение пигментов в плодах может способствовать уменьшению радиальных трещин на них при стрессовых условиях окружающей среды, при этом накопление каротиноидов в плодах будет промежуточным между таковым у образцов с *U* и *u* аллелями. При наличии в генотипе доминантных аллелей *Ant1* и *U* пятно у плодоножки было насыщенно-фиолетовое, при наличии *Ant1* и *U-del52* — слабо-фиолетовое или едва заметное в зависимости от количества падающего света на плод. По результатам данных

исследований разработан Протокол ДНК-типирования нового аллеля *U-del52* гена *GLK*, связанного с накоплением и распределением пигментов (хлорофилла, каротиноидов, флавоноидов) в плодах томата.

Данные оценки соответствия методом Хи-квадрат ( $\chi^2$ ) между наблюдаемыми и ожидаемыми по результатам ДНК-типирования фенотипами представлены в таблице 3. Проведенный анализ подтвердил статистическую достоверность выявленной связи с фенотипическим проявлением признака — слабое зеленое пятно у плодоножки.

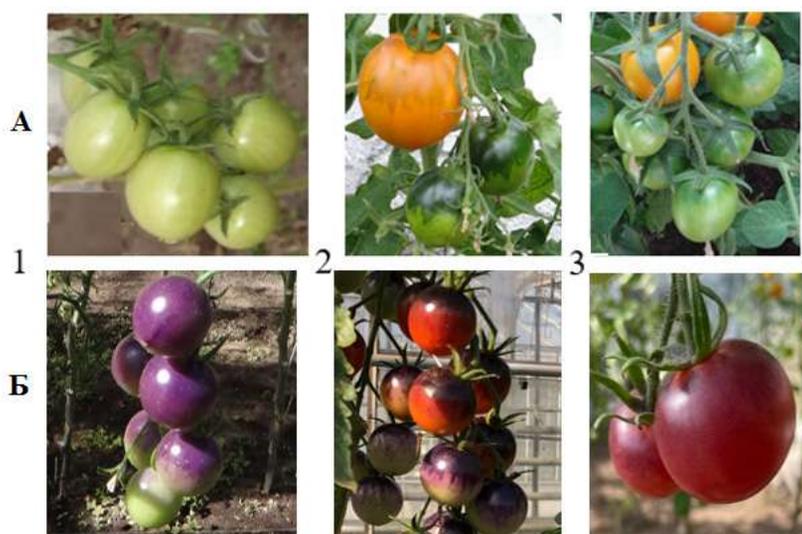


Рис. 6. Фенотипическое проявление аллелей *u* (1), *U* (2) и *U-del52* (3) гена *GLK2*. А — образцы с аллелем *ant1*; Б — образцы с аллелем *Ant1*

Таблица 3

Результаты анализа расщепления популяции  $F_2$  — Индиго (*U*) × Дачный (*U-del52*) методом  $\chi^2$

Показатели	Расщепление			Сумма
	<i>U/U</i>	<i>U/U-del52</i>	<i>U-del52/U-del52</i>	
Ожидаемое расщепление ( $H_0$ )	1	2	1	4
Наблюдаемые частоты ( $f$ )	39	85	33	157
Ожидаемые частоты ( $F$ )	39	78	39	157
Разность частот ( $f-F$ )	0	7	-6	-
Квадрат разности ( $(f-F)^2$ )	0	49	36	-
Отношение $(f-F)^2/F$	0	0,63	0,92	$1,66 = \chi^2$
Окраска плода на стадии технической спелости	Ярко-зеленое / фиолетовое пятно у плодоножки	Зеленое / фиолетовое пятно у плодоножки	Светло-зеленое / фиолетовое пятно у плодоножки	

**Примечание.** Нулевая гипотеза ( $H_0$ ) — ожидаемое расщепление: 1 *U/U* : 2 *U/U-del52* : 1 *U-del52/U-del52*  
 Число степеней свободы —  $(c-1) \times (k-1) = (3-1) \times (2-1) = 2$ ; по таблице определяем  $\chi^2_{теор} = 6,0$ ;  
 $\chi^2_{факт} = 1,66 < \chi^2_{теор} (6,0)$  следовательно, гипотеза верна и расщепление соответствует 1 : 2 : 1

Одной из задач наших исследований была оценка влияния различных аллелей *GLK2* на накопление антоцианов в плодах, для чего, наряду с популяцией  $F_2$  Индиго (*Ant1, U*) × Дачный (*ant1, U-del52*), использована популяция Индиго (*Ant1, U*) × № 17-2020 (*ant1, u*). Наличие аллеля *Anthocyanin 1* (*Ant1*) у родительской формы Индиго позволило также оценить в расщепляющейся популяции характер накопления антоцианов в плодах в зависимости от комбинации аллелей *U, U-del52* или *u* гена *GLK2*. Так была установлена более высокая концентрация антоциана у плодоножки у форм с сочетанием аллелей *U* и *Ant1* и более равномерное распределение по поверхности плода у образцов с аллелями *U-del52* и *Ant1*, а также *u* и *Ant1*. При этом при увеличении интенсивности солнечного света количество антоциана в кожице плодов заметно увеличилось в области его попадания на плод независимо от части плода (рис. 6Б).

В настоящее время нами созданы формы с различным сочетанием генов биосинтеза каротиноидов (*tangerine, beta*), регуляторов накопления антоцианов (*Anthocyanin1*) и трех аллелей гена *GLK2*, созданы новые гибриды  $F_1$  с их различным сочетанием для более детального изучения взаимодействия аллелей при накоплении пигментов в плодах.

### Заключение

Таким образом, в результате исследования полиморфизма гена транскрипционного фактора *Golden 2-like* найден новый аллель *U-del52*. Установлено, что делеция в 52 п. н. (конец экзона 2 – начало интрона 2) в гене *U* ведет к выпадению экзона 2 из зрелой мРНК при ее сплайсинге и синтезу белковой последовательности без MYB-like SANT домена, что изменяет ответную реакцию растения на факторы окружающей среды, прежде всего на интенсивность солнечного света. Выявлено фенотипическое проявление данного аллеля: светло-зеленые плоды со слабым увеличением концентрации хлорофилла у плодоножки на стадии технической спелости, более равномерное распределение пигментов в плодах по сравнению с нормальным аллелем *U* гена *GLK2*. Разработан молекулярный SCAR маркер *U-del52* для выявления данного аллеля. Показана более высокая концентрация антоциана

у плодоножки у форм с сочетанием аллелей *U* и *Ant1* и более равномерное распределение по поверхности плода у образцов с аллелями *U-del52* и *Ant1*. Создан новый селекционный материал для дальнейшего детального изучения взаимодействия аллелей при накоплении пигментов в плодах и селекции, направленной на улучшение качества плодов.

### Список использованных источников

1. Zhao X. et al. Identification and expression analysis of GARP superfamily genes in response to nitrogen and phosphorus stress in *Spirodela polyrhiza* / Xuyao Zhao, Jingjing Yang, Xiaozhe Li, Gaojie Li, Zuoliang Sun, Yan Chen, Yimeng Chen, Manli Xia, Yixian Li, Lunguang Yao and Hongwei Hou. – BMC Plant Biology: 2022. – Vol. 22. – pp. 308–326, <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03696-5>.
2. Fitter D. W. et al. *GLK* gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species / D. W. Fitter, D. J. Martin, M. J. Copley, R. W. Scotland, J. A. Langdale. – Plant J. – 2002 Sep. – Vol. 31, I. 6. – pp. 713–727. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2002.01390.x.
3. Liu Z. et al. Genome-wide characterization and analysis of *Golden 2-Like* transcription factors related to leaf chlorophyll synthesis in diploid and triploid *Eucalyptus urophylla* / Z. Liu, T. Xiong, Y. Zhao, B. Qiu, H. Chen, X. Kang and J. Yang. – Plant Science Sec. Plant Breeding: 2022. – Vol. 13, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.952877>.
4. Nakamura H. et al. Ectopic overexpression of the transcription factor OsGLK1 induces chloroplast development in non-green rice cells / H. Nakamura, M. Muramatsu, M. Hakata, O. Ueno, Y. Nagamura, H. Hirochika, M. Takano and H. Ichikawa. – Plant Cell Physiol.: 2009. – Vol. 50, Is. 11, pp. 1 933–1 949, doi:10.1093/pcp/pcp138.
5. Bravo-Garcia A. et al. Specialization of the *Golden2-like* regulatory pathway during land plant evolution / A. Bravo-Garcia, Y. Yasumura, J. A. Langdale. – New Phytologist: 2009. – Vol. 183. – pp. 133–141.
6. Langdale J. A., C4 cycles: past, present, and future research on C4 photosynthesis. – Plant Cell: 2011. – Vol. 23, Is. 11. – pp. 3 879–3 892. doi: 10.1105/tpc.111.092098.
7. Waters M. T., Wang P., Korkaric M., Capper R. G., Saunders N. J., Langdale J. A. *GLK*

- Transcription Factors Coordinate Expression of the Photosynthetic Apparatus in Arabidopsis. – *Plant Cell*: 2009. – Vol. 21, Is. 4. – pp. 1 109–1 128. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.065250>.
8. Waters M. T., Moylan E. C., Langdale J. A. *GLK* transcription factors regulate chloroplast development in a cell-autonomous manner. – *Plant Journal*: – 2008. – Vol. 56, Is. 3. – pp. 432–444. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03616.x.
9. Powell A. L. T. et al. Uniform ripening Encodes a *Golden 2-like* Transcription Factor Regulating Tomato Fruit Chloroplast Development / A. L. T. Powell, C. V. Nguyen, T. Hill, K. L. Cheng, R. Figueroa-Balderas, H. Aktas, H. Ashrafi, C. Pons, R. Fernández-Muñoz, A. Vicente, J. Lopez-Baltazar, C. S. Barry, Y. Liu, R. Chetelat, A. Granell, A. V. Deynze, J. J. Giovannoni, A. B. Bennett. – *SCIENCE*: 2012. – Vol. 336. – pp. 1 711–1 715.
10. Nguyen C. V. Tomato *Golden2-like* Transcription Factors Reveal Molecular Gradients That Function during Fruit Development and Ripening / Cuong V. Nguyen, Julia T. Vrebalov, Nigel E. Gapper, Yi Zheng, Silin Zhong, Zhangjun Fei, James J. Giovannoni. – *The Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – pp. 585–601.
11. GenBank [Электронный ресурс]. – 2023. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. – Дата доступа: 01.02.2023.
12. Sapir M. et al. Molecular Aspects of Anthocyanin fruit Tomato in Relation to high pigment-1 / M. Sapir, M. Oren-Shamir, R. Ovadia, M. Reuveni, D. Evenor, Y. Tadmor, S. Nahon, H. Shlomo, C. Lhen, A. I. Meir, Levin. – *Journal of Heredity*: 2008. – Vol. 99, Is. 3. – pp. 292–303. doi:10.1093/jhered/esm128.
13. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – 5-е изд., доп. и перераб. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
14. SMART [Электронный ресурс]. – 2023. – Режим доступа: <http://smart.embl-heidelberg.de/>. – Дата доступа: 01.02.2023.

O. G. Babak, E. V. Drozd, N. A. Nekrashevich, N. V. Anisimova, K. K. Yatsevich, A. V. Kilchevsky

## NEW ALLELE OF THE *GOLDEN 2-LIKE* GENE, ITS PHENOTYPIC MANIFESTATION AND BREEDING SIGNIFICANCE IN *SOLANUM LYCOPERSICUM*

State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: O.babak@igc.by

As a result of the study of the gene polymorphism of the *Golden 2-like* transcription factor, a new *U-del52* allele was found. It was established that the deletion of 52 bp (the end of exon 2 and the beginning of intron 2) in the *U* gene leads to the loss of exon 2 from the mature mRNA during its splicing and the synthesis of a protein sequence without the MYB-like SANT domain, which changes the plant's response to environmental factors, primarily to the level of sunlight. The allele's phenotypic manifestation was identified: light green fruits with a slight increase in the concentration of chlorophyll at the stalk at the stage of technical ripeness; a more uniform distribution of pigments in fruits compared to the normal *U* allele of the *GLK 2* gene. The molecular SCAR marker *U-del52* was developed for the identification of this allele. A higher concentration of anthocyanin at the stake was shown in the forms with a combination of *U* and *Ant1* alleles and a uniform distribution over the fruit surface in the samples with *U-del52* and *Ant1* alleles. The new breeding material was developed for further detailed study of the interaction of alleles during the accumulation of pigments in fruits and breeding aimed to improve the quality of fruits.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, *GLK2* gene polymorphism, regulation of pigment synthesis, DNA markers.

Дата поступления в редакцию: 06 февраля 2023 г.

О. А. Орловская<sup>1</sup>, С. И. Вакула<sup>2</sup>, Л. В. Хотылёва<sup>1</sup>, А. В. Кильчевский<sup>1</sup>

## АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЗЕРНА ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ИНТРОГРЕССИЯМИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ВИДОВ РОДА *TRITICUM*

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: O.Orlovskaya@igc.by

<sup>2</sup>Белорусский государственный технологический университет  
Республика Беларусь, 220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а

Исследован аминокислотный состав зерна сортов яровой мягкой пшеницы, образцов тетраплоидных и гексаплоидных видов рода *Triticum*, а также 19 интрогрессивных линий, полученных с их участием (урожай 2020 и 2021 гг.). Суммарное количество заменимых и незаменимых аминокислот в зерне сородичей пшеницы (64,75% и 25,92% соответственно) незначительно превышало данные показатели сортов (64,70% и 25,84% соответственно). У большинства линий с чужеродным генетическим материалом уровень накопления незаменимых аминокислот превосходил обоих родителей, а содержание заменимых аминокислот было ближе к значениям сорта. Значимое превышение интрогрессивных линий над родительскими генотипами установлено по накоплению как заменимых (аспарагиновая кислота, глицин, аргинин, аланин), так и незаменимых аминокислот (изолейцин, треонин, валин). Выделены интрогрессивные линии с высоким содержанием незаменимых аминокислот, которые представляют интерес для увеличения питательной ценности зерна пшеницы.

**Ключевые слова:** виды рода *Triticum*, интрогрессивные линии мягкой пшеницы, заменимые и незаменимые аминокислоты в зерне.

### Введение

Пшеница — одна из самых распространенных сельскохозяйственных культур, которая является основным источником калорий, белка, витаминов и минералов для 2,5 млрд человек [1]. Белок играет значимую роль в питании человека, в связи с чем содержание и аминокислотный состав белка в зерне — важные показатели его питательной ценности [2]. Наибольшую часть запасных белков зерна пшеницы составляют проламины и глютелины, которые богаты аспарагином, глютамином, аргинином и пролином, однако имеют низкое содержание важнейших незаменимых аминокислот — лизина, триптофана, треонина и изолейцина [3, 4, 5]. Незаменимыми аминокислотами считают такие, которые либо не синтезируются в организме, либо синтезируются со скоростью, недостаточной для обеспечения пластических и регенеративных процессов, связанных с образованием новых клеток и тканей [6]. Известно восемь

жизненно необходимых для человека аминокислот: лизин, метионин, триптофан, валин, изолейцин, лейцин, треонин, фенилаланин [7]. Для детей незаменимой аминокислотой также является гистидин. У взрослых гистидин может синтезироваться из других веществ, но в очень малом количестве, поэтому его также нужно получать с пищей, как и незаменимые аминокислоты. Идеальными белками по составу и пропорциям незаменимых аминокислот являются белки молока и куриного яйца. Аминокислотный состав белка пшеницы несбалансирован из-за низкого уровня незаменимых аминокислот, общее количество которых составляет только 42% от их содержания в идеальном белке [8]. Недостаточное поступление незаменимых аминокислот приводит к нарушению обмена веществ, патологическим изменениям в нервной системе, органах внутренней секреции, составе крови и т. д. В связи с этим важно улучшать аминокислотный состав зерна пшеницы. Родственные виды

мягкой пшеницы часто имеют лучшие качественные показатели зерна, чем культивируемые сорта. Например, в зерне однозернянки (*Triticum monocossum* L.), культурной полбы (*Triticum dicocum* (Schrank) Schuebl.), дикой полбы (*Triticum dicoccoides* (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf.), спельты (*Triticum spelta* L.) выявлен повышенный уровень накопления микроэлементов по сравнению с сортами *T. aestivum* [9–2]. В работе X. Jiang с соавторами анализ аминокислотного состава зерна 17 видов рода *Triticum* и сортов мягкой пшеницы показал, что сородичи пшеницы превосходят сорта по содержанию многих аминокислот и белка [8]. Таким образом, дикие и примитивные пшеницы могут служить источником для улучшения питательной ценности зерна современных сортов пшеницы. С целью обогащения генофонда мягкой пшеницы в скрещивания с сортами *T. aestivum* нами были привлечены образцы видов рода *Triticum* (*T. dicoccoides*, *T. dicocum*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. kiharae*). Проведенное ранее изучение коллекции интрогрессивных линий пшеницы с помощью молекулярно-цитогенетического анализа показало, что в геноме этих линий чужеродный генетический материал представлен как в виде небольших участков, так и в виде целых хромосом [13, 14]. Цель данного исследования — оценка особенностей аминокислотного состава зерна линий мягкой пшеницы с интрогрессиями генетического материала видов рода *Triticum*.

### Материалы и методы

В исследование включены 3 сорта яровой мягкой пшеницы (Рассвет, Саратовская 29, Фестивальная), тетраплоидные *T. dicoccoides*, *T. dicocum* и гексаплоидные *T. spelta*, *T. kiharae* виды рода *Triticum*, а также 19 интрогрессивных линий, полученных нами. Из 19 изученных линий 6 создано с участием *T. dicoccoides* (29 Рассвет × *T. dicoccoides* к-5199; 8 Саратовская 29 × *T. dicoccoides*; 13-3, 15-7-1, 15-7-2, 16-5 *T. dicoccoides* × Фестивальная), 6 — с *T. kiharae* (19, 20-1, 25-2 *T. kiharae* × Саратовская 29; 28, 34-1, 34-2 *T. kiharae* × Фестивальная) и 5 — с *T. dicocum* (1-3, 2-7 *T. dicocum* к-45926 × Фестивальная, 206-2, 208-3, 213-1 Pitic S62 × *T. dicocum* к-45926), 2 — с *T. spelta* (7 *T. spelta* к-1731 × Саратовская 29, 1-8

*T. spelta* к-1731 × Рассвет). Образцы чужеродных доноров получены из коллекции ВИР. Растения выращивали на экспериментальных полях Института генетики и цитологии НАН Беларуси в 2020 и 2021 гг. (г. Минск, Республика Беларусь) на дерново-подзолистой супесчаной почве. Минеральные удобрения вносили в следующих дозах: азотные — 80 кг д.в./га, фосфорные — 70 кг д.в./га, калийные — 90 кг д.в./га.

Определение концентрации 8 заменимых (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, глицин, аргинин, аланин, тирозин, пролин) и 7 незаменимых (лизин, валин, изолейцин, лейцин, треонин, фенилаланин, гистидин) аминокислот в зерне пшеницы проводили в Республиканском контрольно-испытательном комплексе по качеству и безопасности продуктов питания РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию» с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением компьютерной системы регистрации. Методика соответствует требованиям ГОСТ 8.010-90. Общее содержание белка в зерне пшеницы определяли на инфракрасном анализаторе «Инфра ЛЮМ ФТ-12» (Люмэкс, Россия).

Результаты эксперимента обобщены с использованием методов описательной статистики, метода главных компонент (англ. principal component analysis, PCA). Средние значения накопления аминокислот в зерне трех групп (сорта, образцы видов *Triticum*, интрогрессивные линии) сравнивали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки. Для визуализации структуры данных содержания незаменимых аминокислот использовали скрипичные графики (violin plot), которые объединяют диаграммы размаха (box-and-whiskers plot) и графики плотности, позволяющие оценить меры центральной тенденции, разброс данных, равномерность распределения наблюдений внутри исследованных групп. Статистические процедуры реализованы в программной среде R.

### Результаты и их обсуждение

Мы оценили аминокислотный состав зерна родительских форм (3 сорта *T. aestivum* и 5 образцов видов рода *Triticum*) и 19 интрогрессивных линий пшеницы, созданных

с их участием (урожай 2020 и 2021 гг.). Данные двухлетнего эксперимента обобщены в средние значения признаков аминокислотного состава зерна для каждого генотипа. Все изученные генотипы пшеницы больше всего накапливали глутаминовой кислоты (29,56–35,01%) и пролина (8,98–11,47%), что согласуется с литературными данными. Например, в сортах пшеницы индийской селекции также показано максимальное накопление данных аминокислот [15, 16]. В работе Wang et al. отмечена наибольшая концентрация глутаминовой кислоты для сортов пшеницы, возделываемых в Китае [17]. Содержание остальных заменимых аминокислот у исследованных нами генотипов находилось в следующих диапазонах: серин — от 4,22 до 5,01%; глицин — от 3,22 до 4,67%; аланин — от 2,90 до 3,90%; аргинин — от 3,59 до 5,0%; тирозин — от 1,81 до 2,78% и было в пределах показателей, полученных в работах зарубежных ученых [2, 15, 16]. Известно, что белки злаковых культур неполноценны по ряду незаменимых аминокислот, прежде всего по лизину, метионину, триптофану и треонину [18]. В нашем исследовании также показано низкое содержание лизина и треонина (содержание метионина и триптофана не определяли). Больше всего изученные генотипы пшеницы накапливали незаменимой аминокислоты лейцина — 5,85–7,39%.

Оценка различий в уровне накопления аминокислот в зерне между группами (сорта, образцы видов *Triticum*, интрогрессивные линии) на основании теста множественных сравнений Тьюки показала, что сорта и сородичи пшеницы достоверно не отличались по содержанию всех изученных аминокислот. В среднем за два года общее количество заменимых аминокислот в зерне сородичей пшеницы и сортов составило 64,75% и 64,70% соответственно, а незаменимых 25,92% и 25,84% соответственно. Содержание заменимых аминокислот было несколько выше у сортов, чем у родственных видов пшеницы, за исключением аспарагиновой и глутаминовой кислот (табл. 1). Больше всего аспарагиновой кислоты нами выявлено в зерне *T. dicoccoides* к-5199 (5,35%), а глутаминовой — в *T. kiharae* (35,01%). Анализ аминокислотного состава зерна китайскими учеными также показал более высокий уровень накопления данных аминокислот у родственных видов по сравнению с сортами *T. aestivum* [8]. Следует отметить важную роль аспарагиновой и глутаминовой кислот для человека, так как среди заменимых аминокислот, в соответствии с современными нормами потребности, доминируют именно эти аминокислоты [6]. Кроме того, глутаминовая кислота участвует в формировании клейковины, определяющей хлебопекарные свойства пшеничной муки [19].

Таблица 1

Содержание заменимых аминокислот в зерне трех групп генотипов пшеницы в среднем за два года, %

Группа генотипов	Асп	Глу	Сер	Гли	Арг	Ала	Тир	Про	$\Sigma$ кол-во
	Среднее (минимум–максимум)								
Сорта	4,47 (4,03–5,25)	31,44 (30,04–32,65)	4,67 (4,34–4,88)	4,11 (3,78–4,27)	4,17 (3,98–4,40)	3,29 (3,04–3,41)	2,42 (2,05–2,63)	10,13 (9,88–10,57)	64,7 (62,84–66,48)
Виды рода <i>Triticum</i>	4,87 (4,48–5,35)	32,60 (30,36–35,01)	4,44 (4,40–4,51)	3,59 (3,36–3,73)	3,89 (3,61–4,19)	3,12 (2,90–3,21)	2,21 (1,81–2,76)	10,03 (9,75–10,44)	64,75 (61,22–66,13)
Интрогрессивные линии	5,41 (4,73–6,11)	31,48 (29,78–33,65)	4,69 (4,22–5,01)	4,05 (3,22–4,67)	4,36 (3,59–5,0)	3,51 (3,05–3,90)	2,38 (2,03–2,78)	9,99 (8,98–11,47)	65,89 (62,11–68,08)

**Примечание.** Асп — аспарагиновая кислота, Глу — глутаминовая кислота, Сер — серин, Гли — глицин, Арг — аргинин, Ала — аланин, Тир — тирозин, Про — пролин

Статистически недостоверное превосходство сородичей пшеницы над сортами наблюдается по накоплению таких незаменимых аминокислот, как фенилаланин, изолейцин и лизин. Исключение составил только образец *T. spelta* к-1731, у которого выявлено самое низкое содержание данных аминокислот среди родительских форм — 4,47%, 2,93% и 2,21% соответственно, что отражено на рисунке 1 в виде выбросов в нижней части скрипичного графика. Можно отметить, что данный образец характеризовался минимальным уровнем накопления изученных незаменимых аминокислот среди видов рода *Triticum* (суммарное количество незаменимых аминокислот составило 23,70%). Полученные нами результаты согласуются с литературными данными. Так, венгерскими учеными при изучении аминокислотного состава диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов рода *Triticum* установлено, что образцы видов *T. dicoccoides*, *T. dicocum*, *T. petropavlovskiyi*, *T. turgidum* (геном AABB) превышали сорта *T. aestivum* по содержанию незаменимых аминокислот на 14,5–27,3%, в то время как виды *T. spelta*, *T. compactum*, *T. macha* (геном AABBDD) имели приблизительно такой же аминокислотный состав, как сорта мягкой пшеницы [20]. Значимых различий по аминокислотному составу зерна между генотипами спельты и мягкой пшеницы не установлено также в работе Smolková с соавторами [21]. Образцы *T. dicocum* к-45926 и *T. kiharae* характеризовались максимальным количеством фенилаланина (5,14% и 5,19% соответственно) и лизина (2,87% и 2,86% соответственно) среди родительских форм. Образец культурной полбы также имел самый высокий уровень изолейцина — 4,02%. Содержание большинства незаменимых аминокислот в зерне сорта Фестивальная ниже, чем у сортов Рассвет и Саратовская 29, что отражено в бимодальном распределении анализируемых признаков в этой группе (рис. 1).

У гибридных генотипов суммарное количество заменимых аминокислот варьировало от 62,11 до 68,08% и в среднем составило 65,89%, что незначительно выше показателя родительских форм (табл. 1). Содержание заменимых аминокислот было, как правило, ближе к значениям сорта и превышало

показатели сородичей пшеницы (табл. 1). Можно отметить, что сорта, виды рода *Triticum* и интрогрессивные линии имели очень схожий уровень накопления пролина — 10,13%, 10,03% и 9,99% соответственно. Достоверное превышение интрогрессивных линий над обоими родителями выявлено по количеству аспарагиновой кислоты ( $p = 0,004$  и  $p = 0,04$ ), превышение над сородичами пшеницы — по содержанию глицина ( $p = 0,04$ ), аргинина ( $p = 0,03$ ) и аланина ( $p = 0,003$ ). Содержание заменимых аминокислот у интрогрессивных линий варьировало в широких пределах, и только размах варьирования по накоплению глутаминовой кислоты не превышал таковой исходных форм (табл. 1). Можно выделить линию 8 Саратовская 29  $\times$  *T. dicoccoides*, которая, как правило, превосходила родительские генотипы по накоплению всех заменимых аминокислот и обладала максимальным количеством серина, глицина, аргинина и аланина.

В среднем за два года в группе интрогрессивных линий уровень накопления незаменимых кислот, как правило, был выше, чем у родительских форм. Только средние значения содержания лейцина во всех трех группах были приблизительно на одном уровне, а содержание фенилаланина у линий было как у сородичей пшеницы (рис. 1). Интрогрессивные линии значимо превышали обоих родителей по количеству изолейцина ( $p = 0,001$  и  $p = 0,009$ ), а родственные виды мягкой пшеницы — треонина ( $p = 0,006$ ) и валина ( $p = 0,02$ ). Подавляющее большинство интрогрессивных линий накапливало больше данных аминокислот, чем исходные формы. Например, из 19 линий по содержанию треонина уровня лучшего родителя не достигали только 3 линии, изолейцина — 4, а валина — 5.

Распределение наблюдений внутри группы интрогрессивных линий чаще всего характеризуется непрерывностью, низким эксцессом и положительной асимметрией (рис. 1), что обусловлено большим объемом выборки относительно небольших родительских групп, а также гибридной природой линий, сочетающих гены диких и культурных форм.

Скрипичные графики показывают, что среди интрогрессивных линий присутствуют генотипы, превосходящие лучшего родителя по содержанию всех изученных незаменимых

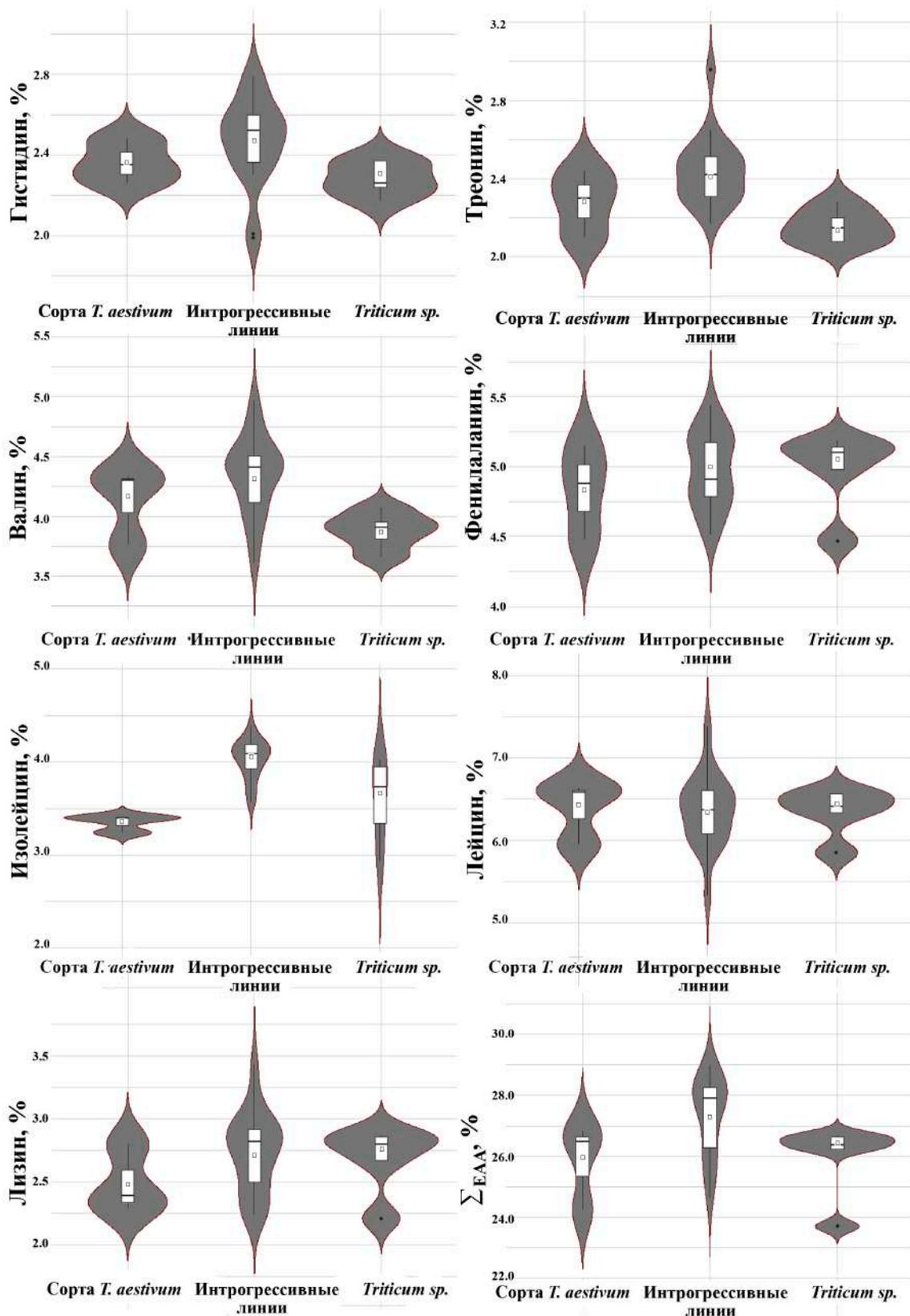


Рис. 1. Скрипичные графики содержания незаменимых аминокислот в зерне трех групп генотипов пшеницы (сорта, образцы видов *Triticum*, интрогрессивные линии) в среднем за два года  
 □ среднее, — 25–75%, T— минимум–максимум, • — выбросы

аминокислот (рис. 1). Например, линии, созданные с участием дикой и культурной полбы, превышали обоих родителей по суммарному количеству незаменимых аминокислот (исключение составили только линии 13-3 и 213-1). Особенно следует выделить линию 15-7-2, у которой содержание всех незаменимых аминокислот было выше, чем у родительских форм. Линия 16-5 превосходила все исследованные генотипы по накоплению изолейцина (4,39%), а линия 29 — лизина (3,43%). Линия 1-3 показала максимальный уровень гистидина, треонина и лейцина (2,96%, 2,96% и 7,39% соответственно); линия 206-2 — валина (4,97%). Среди линий с генетическим материалом *T. kiharae* наиболее высокое суммарное количество незаменимых аминокислот характерно для линии 19 — 28,38%. Можно также отметить линию 34-2, которая превышала все генотипы по содержанию фенилаланина — 5,44%. Возможно, исходные формы имеют разные гены (аллели), детерминирующие накопление данных аминокислот в зерне, сочетание которых в гибридном генотипе обеспечило превосходство интрогрессивных линий пшеницы над обоими родителями.

Ценность аминокислот определяется возможностью их биосинтеза в организме. Например, для человека абсолютно незаменимыми являются лизин и треонин, которые не образуются в организме и поэтому должны непрерывно поступать с пищей. Недостаточное содержание лизина в широко распространенных зерновых продуктах и сравнительно высокая потребность в нем (3–5 г в сутки) делают его одной из наиболее важных незаменимых аминокислот. Эта аминокислота необходима для усвоения кальция и его доставки к костям, также она участвует в сохранении мышечной ткани, поддержании уровня энергии и здоровья сердца. Недостаток в пище лизина приводит к снижению количества эритроцитов и уменьшению в них гемоглобина, к нарушению кровообращения, азотистого баланса и кальцификации костей [22]. Треонин принимает участие в синтезе аминокислот серина и глицина, которые в свою очередь необходимы для производства коллагена и эластина — белков соединительной и мышечной ткани. Кроме

того, треонин требуется для здоровой работы печени и пищеварительного тракта, а также поддерживает работу иммунной системы. Из 19 проанализированных линий в среднем за два года по накоплению треонина и лизина превышали обоих родителей 16 и 9 линий соответственно. Особенно высокое содержание треонина в зерне выявлено для линий 1-3, 8, 25-2 и 19 (2,96%, 2,65%, 2,57% и 2,52% соответственно). Самый высокий процент лизина характерен для линий 29, 19 и 15-7-2 (3,43%, 3,15% и 2,93% соответственно). Следует отметить линию 29, которая обладала повышенным накоплением обеих аминокислот.

Остальные незаменимые аминокислоты в определенных количествах могут синтезироваться в организме человека за счет реакций трансаминирования, но объем их синтеза является недостаточным. Суточная потребность человека в незаменимых аминокислотах (по данным Ф. М. Пруцкова, А. А. Покровского и др.) составляет (в г): лизина — 3–5,2, валина — 3,8–4, лейцина — 4–9, изолейцина — 3–4, метионина — 2–4, треонина — 2–3,5, триптофана — 1–1,1, фенилаланина — 2–4,4 [22]. Лейцин, изолейцин и валин имеют похожие эффекты действия в организме. Данные аминокислоты обеспечивают защиту от неоправданных трат серотонина, то есть предупреждают его дефицит и связанные с этим состояния: депрессии, апатии, тревожные расстройства. Кроме того, изолейцин участвует в регуляции уровня сахара, синтезе гемоглобина, ускорении заживлений после травм, ран и ожогов. Лейцин — регулятор усвояемости белка и, как следствие, роста мышечной массы. При недостатке лейцина в питании у детей происходит задержка роста и снижение массы тела, отмечают изменения в почках и щитовидной железе [23]. Валин — демонстрирует аналогичные лейцину действия, а также обладает способностью защищать миелиновую оболочку нервных волокон. Гистидин играет важную роль в образовании гемоглобина крови. При декарбоксилировании гистидин превращается в гистамин — вещество, имеющее большое значение в расширении сосудистой стенки и ее проницаемости. Недостаток гистидина, так же как и избыток, ухудшает условно-рефлекторную деятельность [24]. Фенилаланин

регулирует функцию щитовидной железы и надпочечников. Из него образуется гормон тироксин, а также аминокислота тирозин, из которого, в свою очередь, образуется адреналин. Тирозин может образовываться из фенилаланина, однако обратного образования фенилаланина из тирозина не происходит [6].

Таким образом, незаменимые аминокислоты широко вовлечены в процессы биосинтеза не только протеинов, но и ферментов, витаминов, некоторых гормонов и играют большую роль в жизнедеятельности организма человека. В связи с этим линии с высоким содержанием данных аминокислот представляют большой интерес для увеличения питательной ценности зерна пшеницы.

Для изучения и упрощения сложных наборов данных используется метод анализа главных компонент (Principal component analysis, PCA). Поиск общих закономерностей между аминокислотным составом и содержанием белка мы провели с помощью анализа главных компонент, основанного на корреляционной матрице 27 генотипов пшеницы. На основании собственных значений (Eigen value, EV) были выделены три главные компоненты, объясняющие большую часть общей дисперсии 71,69%. Первая компонента (EV = 8,75; 48,6% изменчивости) разделяет генотипы пшеницы по суммарному количеству незаменимых аминокислот, аргинина и аланина; вторая (EV = 2,37; 13,2% изменчивости) — по накоплению изолейцина, гистидина, лизина, глицина и белка; третья (EV = 1,78; 9,9% изменчивости) — по содержанию глутаминовой кислоты. Для визуализации результатов анализа главных компонент использовали диаграммы рассеяния, сочетающие проекции наблюдений и переменных на плоскости трех главных компонент (PCA1, PCA2, PCA3) (рис. 2).

Отрицательные значения координат первой главной компоненты, определяющей высокое содержание аланина, аргинина и суммарного количества незаменимых аминокислот, имеют сорт Саратовская 29 и подавляющее большинство интрогрессивных линий (12 из 19 линий): 15-7-2, 16-5, 29, 8, 1-3, 2-7, 206-2, 208-3, 19, 25-2, 28, 34-2. Высокие положительные счета второй главной компоненты, ассоциированной с повышенным накоплением гистидина

и глицина, но пониженным содержанием белка в зерне, имеют все родительские сорта, вид *T. dicoccoides* k-5199, линии 1-3, 2-7, 213-1. Отрицательные координаты по второй главной компоненте (PC2 < -1,5) соответствуют интрогрессивным линиям 13-3, 16-5, 206-2 и образцам *T. dicoccum* k-45926, *T. dicoccoides*, *T. kiharae*. Это высокобелковые формы, с повышенной концентрацией незаменимых аминокислот изолейцина и лизина. Третья главная компонента коррелирует с уровнем глутаминовой кислоты. Положительное значение данной координаты характерно для большинства родительских форм (исключение составили сорт Саратовская 29 и *T. dicoccoides* k-5199) и для 8 из 19 интрогрессивных линий. Максимальное количество глутаминовой кислоты выявлено для *T. kiharae* (35,01%). Следует отметить, что среди линий с генетическим материалом данной синтетической пшеницы только линия 20-1 *T. kiharae* × Саратовская 29 имела низкий уровень глутаминовой кислоты (30,15%). Для остальных линий комбинаций *T. kiharae* × Саратовская 29 и *T. kiharae* × Фестивальная данный показатель варьировал от 32,05 до 33,65%, и был, как правило, выше, чем у других интрогрессивных линий.

В проекции наблюдений на диаграммах рассеяния отражена генетическая структура изучаемой выборки. Сородичи мягкой пшеницы характеризуются исключительно положительными координатами первой главной компоненты, преимущественно низкими значениями второй и высокими значениями третьей компонент. Это группа с высоким содержанием белка, низким суммарным количеством незаменимых аминокислот, высокими уровнями изолейцина, лизина и глутаминовой кислоты. Общей характеристикой родительских сортов пшеницы является высокое значение второй главной компоненты, что отражает низкие концентрации белка, изолейцина, лизина при высоком содержании гистидина и глицина. Для линий с чужеродным генетическим материалом выявлена более широкая дисперсия значений изученных признаков, чем у исходных форм. Максимальная плотность дисперсии наблюдений данной группы соответствует отрицательным значениям первой и третьей компонент, равномерным распределением вдоль второго

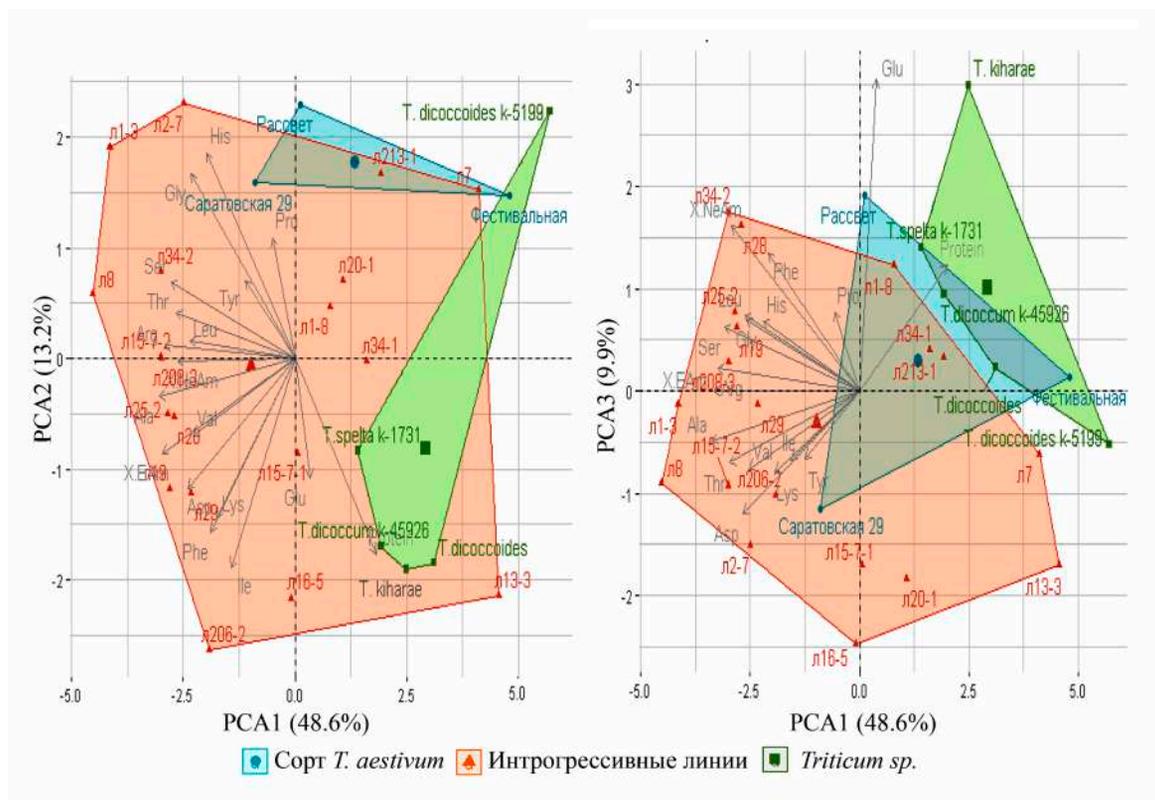


Рис. 2. Проекция наблюдений (образцы пшеницы) и переменных (содержание 15 аминокислот и белка в зерне) на плоскость 1-й и 2-й компонент PCA и на плоскость 1-й и 3-й компонент PCA

главного фактора. Всего одна линия (13-3) проецируется в нижнюю четверть графика, что соответствует низкой суммарной концентрации незаменимых аминокислот в зерне при высоких уровнях белка, изолейцина и лизина. Анализ диаграммы трех главных компонент PCA анализа аминокислотного состава белка позволил выделить интрогрессивные линии, превосходящие обоих родителей по содержанию комплекса аминокислот в оба года:

линия 15-7-2 *T. dicoccoides* × Фестивальная — аспарагиновой кислоты, аланина, тирозина, треонина, валина, фенилаланина;

линия 8 Саратовская 29 × *T. dicoccoides* — аспарагиновой кислоты, серина, глицина, аргинина, аланина, гистидина, фенилаланина, изолейцина;

линия 1-3 *T. dicoccut* к-45926 × Фестивальная — серина, глицина, аргинина, аланина, гистидина, треонина, валина;

линия 2-7 *T. dicoccut* к-45926 × Фестивальная — аспарагиновой кислоты, глицина, аргинина, аланина, гистидина, треонина;

линия 28 *T. kiharae* × Фестивальная — аспарагиновой кислоты, серина, глицина,

аргинина, аланина, гистидина, треонина, валина, изолейцина;

линия 34-1 *T. kiharae* × Фестивальная — аспарагиновой кислоты, серина, глицина, аргинина, треонина, валина;

линия 34-2 *T. kiharae* × Фестивальная — аспарагиновой кислоты, серина, глицина, аргинина, аланина, гистидина, треонина, валина, фенилаланина, изолейцина;

линия 25-2 *T. kiharae* × Саратовская 29 — аспарагиновой кислоты, глицина, аргинина, аланина, гистидина, изолейцина.

### Заключение

Оценка аминокислотного состава зерна пшеницы в течение двух лет показала, что суммарное количество заменимых и незаменимых аминокислот в группе сородичей пшеницы (64,75% и 25,92% соответственно) статистически недостоверно превышало данные показатели в группе сортов (64,70% и 25,84% соответственно). Можно отметить, что содержание заменимых аминокислот было несколько выше у сортов, чем у родственных видов пшеницы, за исключением аспараги-

новой и глютаминовой кислот. Небольшое превосходство сородичей пшеницы над сортами наблюдалось по накоплению таких незаменимых аминокислот, как фенилаланин, изолейцин и лизин. Среди родительских генотипов максимальные значения по содержанию серина, глицина, аргинина, аланина, треонина и лейцина выявлены для сорта Саратовская 29; пролина, гистидина и валина для сорта Рассвет; тирозина, изолейцина и лизина для *T. dicoccum*; аспарагиновой кислоты для *T. dicoccoides*; глютаминовой кислоты и фенилаланина для *T. kiharae*. Линии с чужеродным генетическим материалом характеризовались более широким генетическим разнообразием признаков аминокислотного состава, чем исходные формы. Содержание заменимых аминокислот интрогрессивных линий, как правило, было ближе к значениям сорта и превосходило показатели сородичей пшеницы. Накопление незаменимых аминокислот большинства линий (13 из 19) было выше, чем у обоих родителей. Значимое превышение интрогрессивных линий над родительскими формами установлено по накоплению как заменимых (аспарагиновая кислота, глицин, аргинин, аланин), так и незаменимых аминокислот (изолейцин, треонин, валин).

Среди исследованных генотипов выделены линии с максимальным накоплением незаменимых аминокислот: изолейцина (линия 16-5), лизина (линия 29), гистидина, треонина и лейцина (линия 1-3), фенилаланина (линия 34-2), а также линии с высоким содержанием комплекса аминокислот (линии 15-7-2, 8, 1-3, 2-7, 28, 25-2, 34-1 и 34-2). Данные линии представляют интерес для увеличения питательной ценности зерна пшеницы, так как аминокислоты широко вовлечены в процессы биосинтеза не только протеинов, но также ферментов, витаминов, некоторых гормонов и играют большую роль в жизнедеятельности организма человека.

#### Список использованных источников

1. Shewry, P. R. The contribution of wheat to human diet and health / P. R. Shewry, S. J. Hey. – Food Energy Sec. – 2015. – Vol. 4, № 3. – P. 178–202.
2. Amino acid composition of spring wheats and losses of lysine during chapati baking / F. M. Anjum [et al.]. – J Food Compos Anal. – 2005. – Vol. 18. – P. 523–32.
3. Shewry, P. R. Improving the protein content and composition of cereal grain / P. R. Shewry. – Journal of Cereal Science. – 2007. – Vol. 46, № 3. – P. 239–250.
4. Composition of essential amino acids in emmer wheat landraces, old and modern varieties of bread wheat / P. Konvalina [et al.]. – J. Food Agric. Environ. – 2011. – Vol. 9. – P. 193–197.
5. Chemical composition and amino acid content in different genotypes of wheat flour / A. Laze [et al.]. – Periodica Polytechnica Chemical Engineering. – 2019. – Vol. 63, № 4. – P. 618–628.
6. Лысиков, Ю. А. Аминокислоты в питании человека / Ю. А. Лысиков. – Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2012. – № 2. – С. 88–105.
7. Казаков, Е. Д. Биохимия зерна и продуктов его переработки / Е. Д. Казаков, В. П. Крето-вич. – М.: Агропромиздат, 1989. – 368 с.
8. Protein content and amino acid composition in grains of wheat-related species / Xiao-ling Jiang [et al.]. – Agricultural Sciences in China. – 2008. – Vol. 7, № 3. – P. 272–279.
9. Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin / F. J. Zhao [et al.]. – J. Cereal. Sci. – 2009. – Vol. 49, № 2. – P. 290–295.
10. Genetic diversity for grain nutrients in wild emmer wheat: potential for wheat improvement / M. Chatzav [et al.]. – Annals of Botany. – 2010. – Vol. 105, № 7. – P. 1 211–1 220.
11. Genome-wide association study for grain micronutrient concentrations in wheat advanced lines derived from wild emmer / J. Liu [et al.]. – Front. Plant Sci. – 2021. – Vol. 12. – Pub. 651283.
12. Корреляции и структура вариации признаков качества зерна и продуктивности линий пшеницы с чужеродным генетическим материалом / О. А. Орловская [и др.]. – Сб. науч. тр. – Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2021. – Т. 31: Молекулярная и прикладная генетика. – С. 42–52.
13. Molecular cytogenetic analysis of triticale and wheat lines with introgressions of the genetic material of Triticeae tribe species / O. A. Orlovskaya [et al.]. – Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2016. – Vol. 6, № 5. – P. 527–536.

14. Molecular cytological analysis of alien introgressions in common wheat lines derived from the cross of *Triticum aestivum* with *T. kiharae* / О. А. Орловская [et al.]. – BMC Plant Biology. – 2020. – Vol. 20 (Suppl. 1). – Pub. 201.
15. Jood, S. Amino acid composition and chemical evaluation of protein quality of cereals as affected by insect infestation / S. Jood, A. C. Kapoor, R. Singh. – Plant Foods Hum. Nutr. – 1995. – Vol. 48, № 2. – P. 159–167.
16. Diversity in grain, flour, amino acid composition, protein profiling, and proportion of total flour proteins of different wheat cultivars of North India / R. A. Siddiqi [et al.]. – Front. Nutr. – 2020. – Vol. 7. – Pub. 141.
17. Changes in grain protein and amino acids composition of wheat and rice under short-term increased [CO<sub>2</sub>] and temperature of canopy air in a paddy from East China / J. Wang [et al.]. – New Phytol. – 2019. – Vol. 222. – P. 726–34.
18. Казаков, Е. Д. Биохимия зерна и хлебопродуктов / Е. Д. Казаков, Г. П. Карпиленко. 3-е переработанное и дополненное издание. СПб.: ГИОРД, 2005. – 512 с.
19. Pelleit, P. L. Evaluation of the use of amino acid composition data in assessing the protein quality of meat and poultry products / P. L. Pelleit, V. R. Young. – The American Journal of Clinical Nutrition. – 1984. – Vol. 40 (3 Suppl). – P. 718–736.
20. Pеpó, P. Amino acid compositions in wheat species with different genomes / P. Pеpó, Z. Györi. – Cereal Research Communications. – 2007. – Vol. 35, № 4. P. 1 685–1 699.
21. Aminosauern, enzyme und speicherproteine in 3 dinkelsorten (*Triticum spelta* L.) / H. Smolková [et al.]. – Lebensmittelchemie. – 2000. – Vol. 54. – P. 2–5.
22. Маркевич, Д. В. Сравнительный анализ состава незаменимых аминокислот в основной продукции зерновых культур / Д. В. Маркевич, Ю. В. Путятин, О. М. Таврыкина. – Почвоведение и агрохимия. – 2013. – № 1(50). – С. 178–185.
23. Layman, D. K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis / D. K. Layman. – The Journal of Nutrition. – 2003. – Vol. 133, № 1. – P. 261–267.
24. Long-term effects of low histidine intake on men / E. S. Cho [et al.]. – Journal of Nutrition. 1984. – Vol. 114, № 2. – P. 369–384.

O. A. Orlovskaya<sup>1</sup>, S. I. Vakula<sup>2</sup>, L. V. Khotyleva<sup>1</sup>, A. V. Kilchevsky<sup>1</sup>

## AMINO ACID COMPOSITION OF THE GRAIN OF COMMON WHEAT LINES WITH INTROGRESSIONS OF THE GENETIC MATERIAL OF *TRITICUM* SPECIES

<sup>1</sup>State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: O.Orlovskaya@igc.by

<sup>2</sup>Belarusian State Technological University,

13a, Sverdlova St., 220006 Minsk, the Republic of Belarus

The amino acid composition for spring common wheat varieties, the samples of tetraploid and hexaploid species of the genus *Triticum*, as well as 19 introgressive lines obtained with their involvement (2020–2021 yield) were studied. The total amount of nonessential and essential amino acids in the grain of wheat relatives (64,75% и 25,92% respectively) were slightly higher than in the *T. aestivum* varieties (64,70% and 25,84% respectively). In most lines with foreign genetic material, the level of accumulation of essential amino acids exceeded both parents, and the content of nonessential amino acids was closer to variety values. A significant excess of introgressive lines over parental genotypes was established by the accumulation of both nonessential (aspartic acid, glycine, arginine, and alanine) and essential amino acids (isoleucine, threonine, and valine). Introgressive lines with a high content of essential amino acids have been identified, which are of interest for increasing the nutritional value of wheat grain.

**Keywords:** common wheat related species, introgressive lines of common wheat, nonessential and essential amino acids in grain.

*Дата поступления в редакцию: 06 февраля 2023 г.*

Е. В. Лагуновская

## ОЦЕНКА ГОМОЗИГОТНОСТИ И АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ, У ЛИНИЙ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ

Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: e.antonenko@igc.by

С целью определения гомозиготности линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале, созданных методом индуцированного андрогенеза *in vitro*, проведен анализ внутрелинейного полиморфизма 71 генотипа (18 линий пшеницы и 53 линии тритикале) по 13 ISSR локусам. Подтверждена гомозиготность для 14 ДН-линий пшеницы и 24 ДН-линий тритикале. Проведено KASP-генотипирование отобранных гомозиготных линий по 4 генам, ассоциированным с признаком «масса 1 000 зерен» (*TaTGW6-A1*, *TaGASR7-A1*, *TaGs3-D1*, *TaCKX-D1*), и 6 генам (*Gps-B1*, *TaPod-A1*, *Zds-A1*, *Lox-B1*, *Psy-A1*, *Ppo-A1*), контролирующим качественные характеристики зерна. Показано, что все исследованные линии несут не менее 2 благоприятных аллелей указанных генов. Выделены 7 генотипов пшеницы и 3 генотипа тритикале с комплексом благоприятных аллелей.

**Ключевые слова:** пшеница, тритикале, *Triticum aestivum*, ×*Triticosecale Wittm.*, линии удвоенных гаплоидов, ISSR локусы, KASP, масса 1 000 зерен, качественные характеристики зерна.

### Введение

Пшеница (*Triticum aestivum*) и тритикале (×*Triticosecale Wittm.*) являются ценными зерновыми культурами в большинстве стран мира, в том числе и в Республике Беларусь. На долю пшеницы приходится почти 25% от общего количества калорий и белка, потребляемых людьми во всем мире, больше, чем для любого другого источника продовольствия. Тритикале, представляющее собой гибрид между пшеницей и рожью, также является ценной злаковой культурой, с уникальным сочетанием целого ряда свойств, присущих исходным видам. К их числу относятся высокий потенциал урожайности зерна и зеленой массы, повышенные адаптивные свойства, комплексный иммунитет к грибным заболеваниям, высокое содержание лизина и крахмала в зерне и т. д. Зерно тритикале в основном используется на фураж и как техническое сырье для крахмального и спиртового производства, однако в последние годы, в связи с высоким качеством новых сортов, созданных белорусскими селекционерами, тритикале с успехом применяется в хлебопекарной промышлен-

ности при изготовлении хлеба и печенья [1].

Несмотря на достигнутые успехи, пшеница и тритикале, как и другие сельскохозяйственные культуры, требуют дальнейшего совершенствования. Низкая пластичность сортов (особенно у тритикале), связанная прежде всего с ограниченным генетическим разнообразием исходного материала, приводит к значительному снижению продуктивности под воздействием абиотических и биотических факторов.

Линии удвоенных гаплоидов (doubled haploid lines, ДН-линии), созданные методом индуцированного андрогенеза *in vitro*, являются эффективным материалом для улучшения генетического разнообразия, поскольку ценные сельскохозяйственные признаки могут сохраняться в последующих поколениях и усиливаться по сравнению с исходным генотипом [2].

При получении удвоенных гаплоидов с использованием метода андрогенеза *in vitro* особое внимание уделяется чистоте полученных линий. Поскольку удвоенные гаплоиды пшеницы и тритикале, полученные в куль-

туре пыльников *in vitro*, могут иметь как гаметофитное (из микроспор, гомозиготы), так и спорофитное (из тканей пыльника, гетерозиготы) происхождение, необходим контроль гомозиготности полученных растений-регенерантов. Для этого используют морфологическую оценку полученных форм, однако более быстрые и точные результаты могут быть получены с использованием ДНК-маркеров.

Метод ISSR-анализа (Inter simple sequence repeat — межмикросателлитные повторы) основан на амплификации области между обратно ориентированными, близко расположенными микросателлитами. ISSR-маркирование не требует предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК, одиночные праймеры длиной 15–24 п. о. состоят из нескольких коротких нуклеотидных повторов, используемых для амплификации этих областей, и, как правило, несут на 5' или 3' конце несколько селективных нуклеотидов. Конечный продукт амплификации представляет собой множество фрагментов, отображающихся на электрофореграмме в виде дискретных полос. Применение ISSR-маркеров, сравнительно равномерно распределенных по растительному геному, позволяет одновременно определить изменчивость по группе не связанных между собой локусов, что позволяет, в частности, объективно оценить гомозиготность исследуемых ДН-линий [3, 4].

Другой областью применения ДНК-маркеров является маркер-сопутствующая селекция (marker assisted selection, MAS) — подход, позволяющий при помощи генетических маркеров отбирать генотипы, несущие желательные аллели интересующих исследователя генов. Поиск и определение генетических маркеров, наиболее эффективно контролируемых хозяйственно ценные признаки, в традиционной селекции зерновых культур проводится путем изучения исходного материала в полевых коллекциях, включения его в тестерные, анализирующие и др. виды скрещивания и, как правило, занимает от четырех до шести лет. Применение современных методов изучения исходного материала с использованием ДНК-технологий позволяет с высокой степенью достоверности выделить среди имеющихся образцов те, которые несут необходимый маркированный локус и таким образом

сократить период анализа до месяцев при одновременном увеличении объемов исследуемого материала и сокращении трудовых затрат.

Однонуклеотидный полиморфизм (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) — замена одного нуклеотида в любой части генома в результате естественной мутации — является наиболее изучаемым полиморфизмом в геноме растений. Одним из самых эффективных и быстрых способов анализа SNP является технология KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) — конкурентная аллель-специфичная ПЦР по конечной точке с флуоресцентной детекцией, в которой полиморфизм выявляют с помощью специфичных олигонуклеотидов, содержащих на 3'-конце детектируемую замену. Такая высокопроизводительная геномная маркерная технология очень эффективна для тритикале и мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), поскольку среди злаков геном пшеницы оценивается как один из наименее полиморфных.

Ключевыми параметрами, на которые необходимо опираться при проведении селекции с целью получения высокопродуктивных сортов пшеницы, являются урожайность, качество зерна и устойчивость абиотическим и биотическим факторам.

Признак «масса 1 000 зерен» является одним из основных количественных показателей, определяющим урожайность пшеницы. Он позволяет оценить наличие запасных питательных веществ в зерне, а также рассчитать нормы посева. Данный показатель находится под контролем различных локусов, контролируемых как морфометрические параметры (длина, ширина и толщина зерновки), так и активность различных ферментов растений, в частности, ключевых энзимов, участвующих в углеводном обмене. К генам, контролирующим массу 1 000 зерен, относятся, в частности, *TaTGW6-A1*, *TaGASR7-A1*, *TaGs3-D1*, *TaCKX6-D1* [5].

Качество зерна у пшеницы контролируется генами *Gps-B1*, *Ppo-A1*, *Lox-B1*, *Psy-A1*, *TaPod-A1*, *Zds-A1* и др. Большинство этих генов кодируют ферменты, связанные с биосинтезом и биодegradацией каротиноидов [6]. Каротиноиды (лютеин, зеаксантин, криптоксантин) определяют цвет муки. В синтезе каротиноидов участвуют ферменты, включая

фитоенсинтазу,  $\zeta$ -каротин-десатуразу, фитоен-десатуразу и др. Peroксидазы, широко распространенные в злаках, вызывают деградацию  $\beta$ -каротина и окисление лютеина. Активность всех этих ферментов тесно связана с цветом муки и производимых из нее продуктов, а также с изменением исходного цвета в процессе хранения. Ген *Gps-B1* оказывает влияние на содержание белка в зерне пшеницы, определяя ее пищевую ценность [7].

Установлено, что определенные SNP, инсерции и делеции в последовательностях указанных выше генов оказывают значительное влияние на активность кодируемых ими ферментов и, как следствие, величину параметра «масса 1 000 зерен» и качественные характеристики зерна у пшеницы и тритикале [6, 8].

Целью работы являлась оценка гомозиготности полученных нами в культуре пыльников *in vitro* линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале, и KASP-генотипирование отобранных гомозиготных линий по генам, влияющим на массу 1 000 зерен и качественные характеристики зерна.

### Материалы и методы

Материалом для исследований служили 18 линий удвоенных гаплоидов мягкой яровой пшеницы, 53 линии удвоенных гаплоидов ярового гексаплоидного тритикале, сорт-стандарт для мягкой яровой пшеницы Любава, сорт-стандарт для ярового гексаплоидного тритикале Узор. Линии удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале созданы в лаборатории генетической и клеточной инженерии Института генетики и цитологии НАН Беларуси на основе гибридов  $F_1$  и  $F_2$ , полученных от скрещивания сортов белорусской и зарубежной селекции, и линий удвоенных гаплоидов, различающихся по отзывчивости в культуре пыльников *in vitro* [9, 10]. Сорта пшеницы и тритикале предоставлены РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

Выделение ДНК проводили из индивидуальных зерновок стандартным фенол-хлороформным методом [11]. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре «N50-Touch» (Implen, Германия). Для оценки гомозиготности линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале использовали праймеры к 13 ISSR локусам: *ISSR 2*, *ISSR 17*,

*UBC 807*, *UBC 808*, *UBC 810*, *UBC 811*, *UBC 815*, *UBC 834*, *UBC 835*, *UBC 836*, *UBC 840*, *UBC 841*, *UBC 856* (ОДО «Праймтех», Беларусь) [12, 13]. ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей из расчета на одну реакцию: смесь для ПЦР 5× qPCRmix-HS (Евроген, Россия) — 5 мкл, праймер с концентрацией 5 пМ для анализа определенного ISSR локуса — 2,5 мкл; деонизированную стерильную воду — 12,5 мкл. Концентрация геномной ДНК составляла 100 нг на 25 мкл. Программа амплификации: 94 °C — 5 мин, [94 °C — 30 сек, T отжига °C — 45 сек, 72 °C — 2 мин] — 35 циклов, 72 °C — 10 мин. Температуру отжига выбирали в зависимости от последовательности используемого праймера: 52 °C — *UBC 840*; 53 °C — *ISSR 17*; 54 °C — *UBC 808*, *UBC 815*, *UBC 834*; 55 °C — *UBC 810*, *UBC 811*, *UBC 835*, *UBC 856*; 56 °C — *ISSR 2*, *UBC 807*, *UBC 836*, *UBC 841*. Визуализацию результатов амплификации осуществляли с помощью электрофоретического разделения в 1,2% агарозном геле, при напряжении 90 В в течение 1–1,5 ч. Результаты документировали с помощью системы гель-документирования GelDoc Quantum St4 (Vilber Lourmat, Франция). Размеры амплифицированных фрагментов определяли с помощью маркера молекулярного веса GeneRuler 100 bp и 100 bp+ DNA Ladder (Thermo Scientific, Литва).

Гомозиготность исследуемых ДН-линий определяли с помощью анализа электрофоретического спектра по каждому ISSR локусу для 10 индивидуальных растений. Гомозиготной считали линию с идентичным количеством и размером полученных фрагментов у всех анализируемых индивидуальных растений по всем исследуемым ISSR локусам.

KASP-генотипирование образцов проводили по 4 генам, ассоциированным с признаком «масса 1 000 зерен», (*TaTGW6-A1*, *TaGASR7-A1*, *TaGs3-D1*, *TaCKX-D1*) и 6 генам (*Gps-B1*, *TaPod-A1*, *Zds-A1*, *Lox-B1*, *Psy-A1*, *Ppo-A1*), контролирующим качественные характеристики зерна у пшеницы и тритикале.

Для определения аллельных вариантов отобранных генов методом KASP-генотипирования с использованием различных баз данных (GenBank, GrainGenes, Gramene, European Wheat Database) и литературных источников

нами подобраны аннотированные ДНК последовательности для моделирования и синтеза KASP праймеров. Информация о детектируемых полиморфизмах представлена в таблице 1. Хромосомная позиция указана для сборки генома *Triticum aestivum* IWGSC CS RefSeq v2.1 (GCF\_018294505.1) [14].

ПЦР при выполнении KASP-генотипирования проводили в реакционной смеси объемом 10 мкл, содержащей следующие компоненты: 30× KASP by Design Primer Mix (содержит аллель-специфичные праймеры: 3 KASP-праймера, специальным образом синтезированных для анализа целевого участка с SNP или вставкой/делецией (LGC Biosearch Technologies, Великобритания)) — 0,14 мкл; KASP V4.0 2X Master mix (LGC Biosearch Technologies, Великобритания) — 5,0 мкл; ДНК исследуемых генотипов пшеницы 15–30 нг / 2 мкл, бидистиллированная вода — до конечного объема. Для проведения амплификации с детекцией в режиме реального времени программировали прибор CFX96 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, США) следующим образом: 94,0 °C — 15 мин, [94,0 °C — 20 сек, 61,0 °C —

60 сек] — 10 циклов, [94,0 °C — 20 сек, 55,0 °C — 60 сек] — 26 циклов, шаг считывания флуоресцентного сигнала на 37 °C в течение 1 мин.

Визуализацию результатов осуществляли с использованием программы CFX Maestro™, BioRad. Результаты генотипирования оценивали на основании анализа 2D-графика аллельной дискриминации, на котором по оси X показаны стандартизованные данные финального уровня флуоресценции для первого флуорофора FAM (RFU<sup>1</sup>, относительные единицы флуоресценции), по оси Y — для второго флуорофора HEX (RFU<sup>2</sup>).

На первом этапе исследования каждая проба представляла собой пул из ДНК пяти индивидуальных растений одного генотипа. Если в результате генотипирования проба определялась как гетерозигота, проводили повторное генотипирование с использованием ДНК каждого индивидуального растения в отдельности. В зависимости от значений уровней флуоресценции RFU<sup>1</sup> и RFU<sup>2</sup>, а также от соотношения RFU<sup>1</sup> / RFU<sup>2</sup>, для каждого исследуемого образца пшеницы устанавливали определенный генотип.

Таблица 1

Полиморфизмы генов, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками у пшеницы и тритикале, детектируемые с помощью KASP-маркеров

Локус	Хромосомная позиция	Полиморфизм FAM / HEX	Аллель	Фенотип	Ссылка
<i>TaTGW6-A1</i>	Chr.3A:722646994G > A (NC_057800.1)	G / A	<i>TaTGW6-A1a</i> / <i>TaTGW6-A1b</i>	Высокая / низкая масса 1 000 зерен	[15]
<i>TaGASR7-A1</i>	Chr.7A:175964414- 175964406_ins1369b.p. (NC_057812.1)	инсерция – / инсерция +	<i>H1g</i> / <i>H1c</i>	Уменьшение / увеличение длины зерновки и массы 1 000 зерен	[16]
<i>TaGs3-D1</i>	Chr.7D:6833179G > T (NC_057814.1)	G / T	<i>TaGS3-D1a</i> / <i>TaGS3-D1b</i>	Увеличение / уменьшение длины зерновки и массы 1 000 зерен	[17]
<i>TaCKX-D1</i>	Chr.3D:del107236227- 107236244 (NC_057802.1)	делеция + / делеция –	<i>TaCKX-D1a</i> / <i>TaCKX-D1b</i>	Высокая / низкая масса 1 000 зерен	[18]
<i>Xuhw89</i> (тесно сцеплен (0,1 сМ) с <i>Gpc-B1</i> )	Chr.6B:del140409139- 140409142 (NC_057810.1)	делеция + / делеция –	<i>Gpc-B1b</i> / <i>Gpc-B1a</i>	Высокое / низкое содержание белка	[7]
<i>TaPod-A1</i>	Chr.3A:731158150G > A (NC_057800.1)	G / A	<i>TaPod-A1b</i> / <i>TaPod-A1a</i>	Высокая / низкая активность пероксидазы	[19]

## Окончание таблицы 1

Локус	Хромосомная позиция	Полиморфизм FAM / HEX	Аллель	Фенотип	Ссылка
<i>Zds-A1</i>	Chr.2A:325477392C > G (NC_057797.1)	C / G	<i>Zds-A1a</i> / <i>Zds-A1b</i>	Низкое / высокое содержание желтого пигмента	[20]
<i>TaLox-B1</i>	Chr.4B:30022405G > C (NC_057804.1)	G / C	<i>TaLox-B1b</i> / <i>TaLox-B1a</i>	Высокая / низкая активность липоксигеназы	[21]
<i>Psy-A1</i>	Chr.7A:735889561_ ins38b.p. (NC_057812.1)	инсерция – / инсерция +	<i>Psy-A1a</i> / <i>Psy-A1b</i>	Высокое / низкое содержание желтого пигмента	[22]
<i>Ppo-A1</i>	Chr.2A:715938171A > T (NC_057797.1)	A / T	<i>Ppo-A1a</i> / <i>Ppo-A1b</i>	Высокая / низкая активность полифенолоксидазы	[23]

## Результаты и обсуждение

Для оценки гомозиготности полученных удвоенных гаплоидов с помощью 13-ти маркеров к ISSR-локусам были изучены 18 линий удвоенных гаплоидов пшеницы и 53 линии удвоенных гаплоидов тритикале. Выбор ISSR-маркеров, использованных в исследовании, основывался на данных литературы [12, 13]. В данном исследовании были использованы маркеры, показавшие наибольший полиморфизм и, как следствие, информативность для исследуемых линий.

Полученные результаты выявили как отсутствие, так и наличие внутрилинейного полиморфизма по исследуемым локусам у линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале. На рисунке 1 представлен пример внутрилинейного полиморфизма у индивидуальных растений удвоенного гаплоида пшеницы ДН-66-2-1-12. Стрелками показаны некоторые полиморфные фрагменты. У данной линии полиморфизм проявился в отсутствии у одного из 10 индивидуальных растений двух фрагментов, присутствующих у остальных 9 растений.

В результате проведенного исследования были получены данные по количеству гомо- и гетерозиготных линий удвоенных гаплоидов для каждого ISSR локуса (табл. 2)

Следует отметить, что степень гомозиготности по исследуемым ISSR локусам различалась у линий пшеницы и тритикале. Только локус *ISSR 17* демонстрировал невысокую гомозиготность для обеих групп ДН-линий, в остальном низко гомозиготные локусы для

ДН-линий пшеницы могли одновременно быть высоко гомозиготными для ДН-линий тритикале.

Так, у линий удвоенных гаплоидов пшеницы наименьший полиморфизм наблюдался для локуса *ISSR 2*, гомозиготность по которому обнаружена у 94,4% линий. По локусам *UBC 815*, *UBC 834*, *UBC 836*, *UBC 840*, и *UBC 841* гомозиготность выявлена у 88,9% ДН-линий. По локусам *UBC 808*, *UBC 810* и *UBC 811*, *UBC 835* гомозиготность наблюдалась у 83,3% исследованных линий. По локусам *ISSR 17*, *UBC 807* и *UBC 856* 77,8% линий оказались гомозиготными.

Для тритикале наименьший внутрилинейный полиморфизм наблюдался для локуса *UBC 856*, гомозиготность по которому обнаружена у 96,2% исследованных линий. При этом для ДН-линий пшеницы гомозиготность

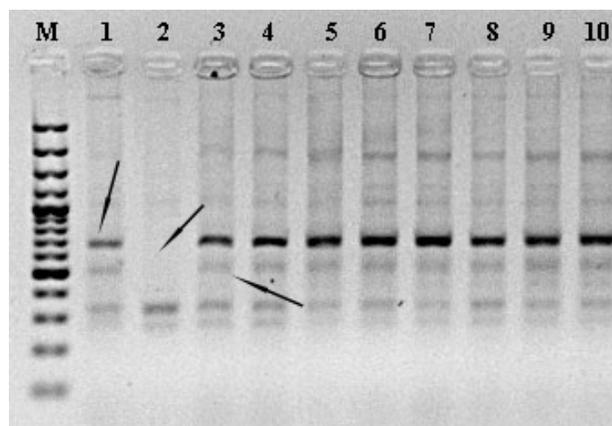


Рис. 1. Внутрилинейный полиморфизм по ISSR локусу *UBC 807* у линии ДН-66-2-1-12

**Таблица 2**

Соотношение гомо- и гетерозиготных ДН-линий пшеницы и тритикале по отдельным ISSR локусам

ISSR локус	ДН-линии пшеницы				ДН-линии тритикале			
	гомозиготные, шт.	%	гетерозиготные, шт.	%	гомозиготные, шт.	%	гетерозиготные, шт.	%
ISSR 2	17	94,4	1	5,6	42	79,2	11	20,8
ISSR 17	14	77,8	4	22,2	41	77,4	12	22,6
UBC 807	14	77,8	4	22,2	47	88,7	6	11,3
UBC 808	15	83,3	3	16,7	46	86,8	7	13,2
UBC 810	15	83,3	3	16,7	42	79,2	11	20,8
UBC 811	15	83,3	3	16,7	45	84,9	8	15,1
UBC 815	16	88,9	2	11,1	43	81,1	10	18,9
UBC 834	16	88,9	2	11,1	46	86,8	7	13,2
UBC 835	15	83,3	3	16,7	46	86,8	7	13,2
UBC 836	16	88,9	2	11,1	48	90,6	5	9,4
UBC 840	16	88,9	2	11,1	45	84,9	8	15,1
UBC 841	16	88,9	2	11,1	44	83,0	9	17,0
UBC 856	14	77,8	4	22,2	51	96,2	2	3,8

по этому локусу была одной из самых низких.

Гомозиготность по локусу *UBC 836* выявлена у 90,6% линий, по локусу *UBC 807* — у 88,7%, по локусам *UBC 808*, *UBC 834*, *UBC 835* — у 86,8% линий. По локусам *UBC 811* и *UBC 840* гомозиготность проявили 84,9% линий, по локусу *UBC 841* — 83,0%, по локусу *UBC 815* — 81,1%, по локусам *ISSR 2* и *UBC 810* — 79,2% исследованных линий удвоенных гаплоидов. Наибольший полиморфизм наблюдался по локусу *ISSR 17*, гомозиготными по которому являлось 77,4% линий.

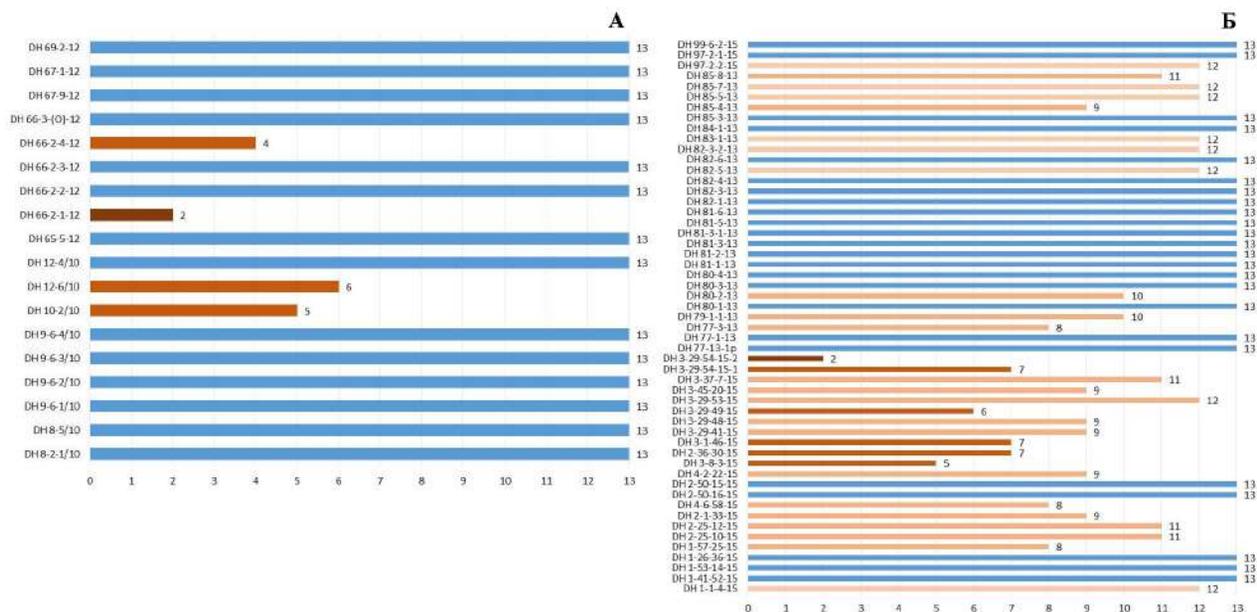
Анализ полученных данных позволил выделить гомо- и гетерозиготные линии удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале (рис. 2). По оси X указано количество гомозиготных ISSR локусов для конкретной ДН-линии.

Таким образом, с применением 13 ISSR маркеров определена степень гомозиготности линий удвоенных гаплоидов, полученных в культуре пыльников *in vitro*. Из 18 созданных

линий удвоенных гаплоидов пшеницы гомозиготными по всем 13 ISSR локусам оказались 14 линий (77,8%). Для тритикале из 53 созданных ДН-линий гомозиготными оказались 24 линии (45,3%). Линии, проявившие гетерозиготность хотя бы по одному исследуемому локусу, были отбракованы, и дальнейшая работа велась только с линиями с подтвержденной гомозиготностью по всем 13 локусам.

Для выяснения целесообразности включения созданных линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале в селекционный процесс, отобранные гомозиготные линии удвоенных гаплоидов были оценены на наличие благоприятных аллелей генов, контролируемых хозяйственно-ценные признаки — масса 1 000 зерен и качественные характеристики зерна.

Нами проведено KASP-генотипирование 14 гомозиготных линий удвоенных гаплоидов и сорта-стандарта для мягкой яровой пшеницы Любава, а также 24 линий и сорта-стандарта для ярового гексаплоидного тритикале

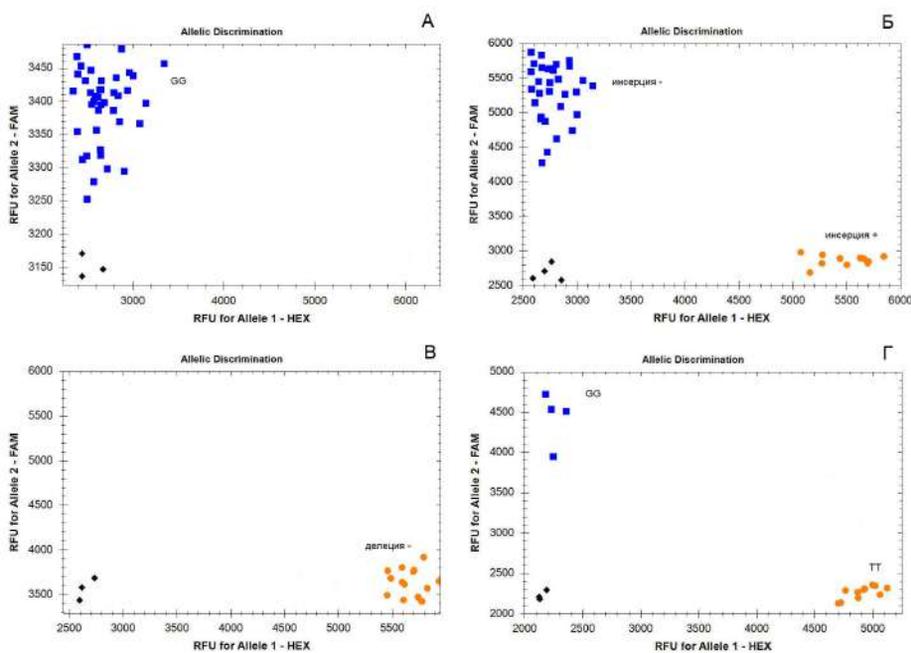


**Рис. 2.** Количество гомозиготных ISSR локусов у линий удвоенных гаплоидов пшеницы (А) и тритикале (Б), созданных методом индуцированного андрогенеза *in vitro*

Узор по 4 генам (*TaTGW6-A1*, *TaGASR7-A1*, *TaGs3-D1*, *TaCKX-D1*), ассоциированным с признаком «масса 1 000 зерен» и 6 генам (*Gps-B1*, *TaPod-A1*, *Zds-A1*, *Lox-B1*, *Psy-A1*, *Ppo-A1*), ответственным за качественные характеристики зерна с целью выявления генотипов с благоприятными аллелями и гап-

типами указанных генов (*TaTGW6-A1a*, *H1c*, *TaGS3-D1a*, *TaCKX-D1a*, *Gpc-B1b*, *TaPod-A1a*, *Zds-A1b*, *TaLox-B1a*, *Psy-A1a*, *Ppo-A1*).

Данные, полученные при KASP-генотипировании по генам, ассоциированным с признаком «масса 1 000 зерен», представлены на рисунке 3.



**Рис. 3.** 2D-график аллельной дискриминации: А — для однонуклеотидной замены G > A в гене *TaTGW6-A1*; Б — для наличия / отсутствия инсерции в гене *TaGASR7-A1*; В — для наличия / отсутствия делеции в гене *TaCKX6-D1*; Г — для однонуклеотидной замены G > T в гене *TaGs3-D1*

Ген *TaTGW6-A1*, расположенный на хромосоме 3A пшеницы, кодирует фермент ИУК-гликозил-гидролазу. Три SNP (G > A в положении 339 п. н., T > C в положении 368 п. н. и C > G в положении 418 п. н.), обнаруженные между сортами с более высокой и низкой массой 1 000 зерен, образуют два аллеля: *TaTGW6-A1a* и *TaTGW6-A1b*. Наличие аллеля *TaTGW6-A1a* коррелирует с увеличением массы 1 000 зерен [15]. Все исследованные линии пшеницы и тритикале несли благоприятный аллель *TaTGW6-A1a* (рис. 3А).

Ген *TaGASR7-A1* пшеницы располагается на хромосоме 7A, является гомологом гена *GASR7* риса, связанного с длиной зерновки, влияет как на длину зерновки, так и на массу 1 000 зерен. Описаны 2 основных гаплотипа (*H1c* и *H1g*), различающиеся наличием либо отсутствием инсерции размером 1 495 п. н. в 5'-проксимальной области в положении -124 п. н. перед стартовым кодоном [16]. Среди исследованных сортов и линий пшеницы и тритикале благоприятный гаплотип *H1c* выявлен у десяти генотипов: одного генотипа пшеницы (сорт Любава) и девяти ДН-линий тритикале (ДН 1-41-52-15, ДН 1-53-14-15, ДН 2-50-16-15, ДН 80-1-13, ДН 80-3-13, ДН 80-4-13, ДН 81-5-13, ДН 82-3-13, ДН 82-4-13). Неблагоприятный гаплотип *H1g* выявлен у 30 образцов (рис. 3Б).

Ген *TaCKX6-D1*, расположенный на хромосоме 3D пшеницы, относится к мультигенному семейству генов *CKX*, кодирующих белки цитокининоксидазы/дегидрогеназы и играющих важную роль в продуктивности растений. В зависимости от наличия/отсутствия делеции во втором интроне выделяют 2 аллеля: *TaCKX6-D1a* и *TaCKX6-D1b* [18]. Поскольку локус располагается на D-геноме, у тритикале он не может быть идентифицирован, а все образцы пшеницы несли неблагоприятный аллель *TaCKX6-D1b* (рис. 3В).

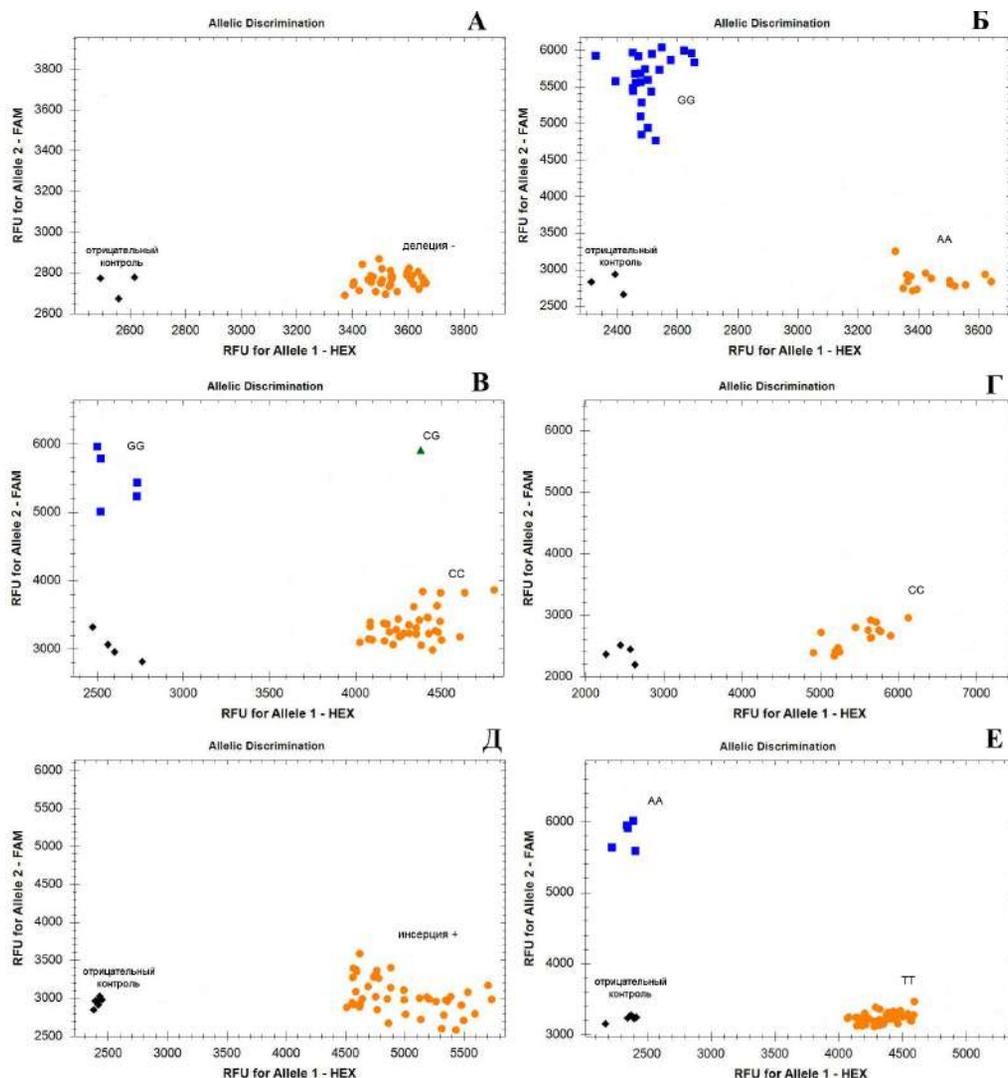
Ген *TaGs3-D1*, также являющийся гомологом гена риса, расположен на хромосоме 7D пшеницы и контролирует размер зерновки. Наличие SNP G > T во втором интроне приводит к возникновению двух аллелей *TaGs3-D1a* и *TaGs3-D1b* [17]. Среди исследованных образцов пшеницы были выявлены 4 образца с генотипом G / G (благоприятный аллель *TaGs3-D1a*) — ДН 65-5-12, ДН 67-9-12, ДН

67-1-12, ДН 69-2-12 (рис. 3Г).

Для выявления генотипов, несущих благоприятные аллели генов, контролирующих качественные характеристики зерна, проведено KASP генотипирование исследуемых образцов по генам *Gps-B1*, *Ppo-A1*, *Lox-B1*, *Psy-A1*, *TaPod-A1*, *Zds-A1* (рис. 4).

Ген *Gpc-B1* контролирует содержание белка в зерновках. Функциональный аллель *Gpc-B1b*, улучшает ремобилизацию азота из стебля, увеличивая содержание белка в зерновке, и сокращает период налива зерна. Для выявления функционального аллеля часто используют кододоминантный маркер *Xuhw89*, расположенный на расстоянии 0,1 сМ от *Gpc-B1* [7]. Анализ полученных данных показал, что по гену *Gpc-B1*, связанному с накоплением белка в зерновке, все исследованные генотипы несут неблагоприятный аллель *Gpc-B1a*, связанный с пониженным содержанием белка (рис. 4А). Это согласуется с данными, полученными другими авторами. Аллель *Gpc-B1b* обнаруживается лишь в небольшом количестве современных коммерческих сортов пшеницы. Так, скрининг 196 сортов мягкой пшеницы из базовой коллекции INRA (Франция) показал, что только пять из них несут аллель дикого типа *Gpc-B1b* [24]. Также в результате скрининга 365 сортов и линий озимой мягкой пшеницы, культивируемых в Китае, не было обнаружено ни одного сорта, содержащего функциональный аллель *Gpc-B1b* [25]. При этом скрининг 138 сортов яровых пшениц, имеющих северное происхождение (Скандинавия, Финляндия, Карелия и Кольский полуостров), было обнаружено, что аллель дикого типа несли 33% образцов [24], что позволяет говорить о том, что сорта, несущие функциональный аллель, преимущественно произрастают в северных широтах и, возможно, играют роль в адаптации к холодному климату.

Ген *TaPod-A1* расположен на длинном плече хромосомы 3A, кодирует фермент пероксидазу, вызывающий деградацию пигментов, в частности, окисление бета-каротина и лютеина, чем ухудшает цвет муки и качество конечных продуктов. Сорта с низкой и высокой активностью полифенолоксидазы несут аллели *TaPod-A1a* и *TaPod-A1b* соответственно. Между двумя аллелями в экзонах *TaPod-A1* обнаружено пять однонуклеотидных полимор-



**Рис. 4.** 2D-график аллельной дискриминации: А — для наличия / отсутствия делеции в гене *Gpc-B1*; Б — для однонуклеотидной замены  $A > G$  в гене *TaPod-A1*; В — для однонуклеотидной замены  $C > G$  в гене *Zds-A1*; Г — для однонуклеотидной замены  $C > G$  в гене *TaLox-B1*; Д — для инсерции/делеции в гене *Psy-A1*; Е — для однонуклеотидной замены  $A > T$  в гене *Ppo-A1*

физмов:  $A > G$  в положении 138 п. н.,  $G > T$  в положении 237 п. н.,  $A > G$  в положении 462 п. н.,  $A > G$  в положении 769 п. н. и  $T > A$  в положении 866 п. н. [19]. Благоприятный аллель *TaPod-A1a*, связанный с низкой пероксидазной активностью, несли 15 образцов: 5 генотипов пшеницы (Любава, ДН 8-5/10, ДН 66-2-2-12, ДН 66-2-3-12, ДН 66-3-(O)-12) и 10 генотипов тритикале (Узор, ДН 1-41-52-15, ДН 2-50-16-15, ДН 2-50-15-15, ДН 80-1-13, ДН 80-3-13, ДН 80-4-13, ДН 84-1-13, ДН 97-2-1-15, ДН 99-6-2-15) (рис. 4Б).

Ген *Zds-A1* расположен на хромосоме 2A, кодирует фермент  $\zeta$ -каротин-десатуразу, который является ключевым ферментом в пути

биосинтеза каротиноидов и определяет содержание желтого пигмента в зернах пшеницы. На основании SNP  $C > G$  в двенадцатом интроне выделяют два аллеля: *Zds-A1a* и *Zds-A1b* [20]. Показано, что среди 217 сортов и линий пшеницы, выращиваемой в Китае, среднее содержание желтого пигмента в зерне у 126 сортов с аллелем *TaZds-A1b* было на 7,8% выше, чем у 91 сорта с аллелем *TaZds-A1a* [20]. Большинство исследуемых нами образцов несли благоприятный аллель *TaZds-A1b* (генотип  $G / G$ , ассоциирован с высоким содержанием желтого пигмента), кроме образцов пшеницы Любава, ДН 66-2-2-12, ДН 66-2-3-12 и образцов тритикале ДН 85-4-15. Сорт Узор по гену

*Zds-A1* был неоднороден, что подтверждено отдельным генотипированием каждого индивидуального растения. Три из пяти проанализированных индивидуальных растений имели генотип *C/C* (аллель *TaZds-A1a*), два растения являлись гетерозиготами по данному гену (генотип *C/G*, *TaZds-A1a/TaZds-A1b*). На 2D-графике аллельной дискриминации этот сортообразец представлен как гетерозигота (обозначен треугольником) (рис. 4B).

Ген *TaLox-B1* расположен на коротком плече хромосомы 4B, кодирует фермент липоксигеназу, активность которой в зерне влияет на цвет и качество обработки продуктов на основе пшеницы. Обнаружено, что низкая активность или делеция гена *TaLox-B1* могут эффективно снижать окисление липидов, тем самым уменьшая окислительное разрушение зерна и продлевая период хранения и повышая коммерческую ценность сортов. На основании SNP *C > G* в третьем экзоне выделяют два аллеля: *TaLox-B1a* и *TaLox-B1b* [21]. С использованием KASP-маркеров к данному гену продукт амплификации был получен только у образцов пшеницы, на ДНК образцов тритикале данный праймер не отжигался. Все 15 исследованных нами генотипов пшеницы несли благоприятный аллель *TaLox-B1a* (генотип *C/C*), связанный с низкой активностью липоксигеназы (рис. 4Г).

Ген *Psy1-A1* расположен на хромосоме 7A, кодирует фитоен-синтазу 1 — один из ключевых ферментов в пути биосинтеза каротиноидов, активность которого напрямую коррелирует с содержанием желтого пигмента в зерне пшеницы [26]. Все исследуемые генотипы несли нежелательный аллель *Psy-A1b* (инсерция в 37 п. н.), связанный с низким содержанием желтого пигмента (рис. 4Д).

Ген *Pro-A1* расположен на хромосоме 2A, кодирует фермент полифенолоксидазу — широко распространенный медьсодержащий фермент, вызывающий реакции потемнения во многих растительных продуктах, в том числе приготовленных из злаков. На основании SNP *A > T* в первом интроне выделяют два аллеля: *Pro-A1a* и *Pro-A1b* [23]. Большинство исследованных генотипов несли благоприятный аллель *Pro-A1b*, связанный с низкой активностью фермента, кроме образцов тритикале Узор ДН 1-41-52-15, ДН 1-53-14-15, ДН 1-26-

36-15, ДН 2-50-16-15, которые несли аллель *Pro-A1a* (рис. 4Е).

Таким образом, KASP-генотипирование 40 линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале по генам, ассоциированным с хозяйственно ценными признаками, показало, что все исследованные линии несут не менее 2 благоприятных аллелей исследованных генов. Наибольшее количество благоприятных аллелей (пять) обнаружено у семи образцов пшеницы (сорт Любава, ДН 8-5/10, ДН 65-5-12, ДН 66-3-(O)-12, ДН 67-9-12, ДН 67-1-12, ДН 69-2-12). Остальные линии удвоенных гаплоидов пшеницы несли по 4 благоприятных аллеля. Среди исследованных генотипов тритикале по пять благоприятных аллелей выявлено у линий ДН 80-1-13, ДН 80-3-13, ДН 80-4-13, по 4 аллеля — у линий ДН 1-41-52-15, ДН 2-50-16-15, ДН 81-5-15, ДН 82-3-13, ДН 82-4-13, ДН 84-1-13, ДН 97-2-1-15, ДН 99-6-2-15. У сорта-стандарта Узор обнаружено всего 2 благоприятных аллеля по генам *TaTGW6-A1* и *TaPod-A1*.

Полученные данные об аллельном составе исследуемых генов и частоте встречаемости благоприятных и неблагоприятных аллелей в целом согласуются с данными, полученными нами ранее при анализе сортов и сортообразцов пшеницы белорусской и зарубежной селекции и информацией по европейским сортам [24, 27].

## Заключение

Линии удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале представляют собой новый селекционный материал и могут превосходить родительские генотипы по ряду параметров, однако необходим контроль генетической чистоты получаемого материала, в частности их гомозиготности. Использование ISSR-маркеров позволяет эффективно и быстро выделять гомозиготные и гетерозиготные ДН-линии. KASP-генотипирование по генам, контролирующим хозяйственно-ценные признаки, с целью выявления генотипов с благоприятными аллелями и включения их в систему скрещиваний, позволяет значительно ускорить получение новых высокоурожайных сортов пшеницы и тритикале, обладающих требуемым качеством зерна для изготовления определенных конечных продуктов в зависимости от ре-

гиона их потребления.

Установлено, что полученные нами линии удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале с подтвержденной гомозиготностью не уступают контрольным сортам по наличию благоприятных аллелей генов, ассоциированных с важными хозяйственно ценными признаками, такими как масса 1 000 зерен, сниженная активность ферментов, ухудшающих качество муки и производимых из нее продуктов, содержание желтого пигмента в зерне и могут быть включены в селекционный процесс для ускоренного получения новых высокоурожайных, с повышенным качеством зерна, сортов пшеницы и тритикале.

### Список использованных источников

1. Генофонд, методы и приоритеты селекции ярового тритикале в Беларуси / С. И. Гриб [и др.]. – Инновационные сорта и технологии возделывания ярового тритикале / редкол.: С. М. Лукин, И. В. Русакова, А. М. Тысленко; Всероссийский научно-исследовательский институт органических удобрений и торфа. – Владимир; Иваново, 2017. – С. 59–79.
2. Progress in doubled haploid technology in higher plants / M. Wędzony [et al.]. – *Advances in haploid production in higher plants* / eds. A. Touraev [et al.]. – Dordrecht, 2009. – P. 1–33.
3. Djamila, K. Using inter simple sequence repeat (ISSR) markers to study genetic polymorphism of pistachio (*Pistacia vera* L.) in Algeria / K. Djamila, B. Ammar, M. Med. – *African J. of Biotechnology*. – 2012. – Vol. 11, 29. – P. 7 354–7 360.
4. Girma, G. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) analysis of wild and cultivated rice species from Ethiopia / G. Girma, K. Tesfaye, E. Bekele. – *African Journal of Biotechnology* – 2010. – Vol. 9, № 32. – P. 5 048–5 059.
5. Molecular characterization of 87 functional genes in wheat diversity panel and their association with phenotypes under well-watered and water-limited conditions / M. Khalid [et al.]. – *Front. Plant Sci.* – 2019. – Vol. 10 – Art. 717.
6. Utilization of KASP technology for wheat improvement / B. Kaur [et al.]. – *Cereal Research Communications*. – 2020. – Vol. 48. – P. 409–421.
7. Physical map of the wheat high-grain protein content gene *Gpc-B1* and development of a high-throughput molecular marker / A. Distelfeld [et al.]. – *New Phytol.* – 2006. – Vol. 169, № 4. – P. 753–63.
8. Validation of candidate gene-based markers and identification of novel loci for thousand-grain weight in spring bread wheat / D. Sehgal [et al.]. – *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – Art. 1189.
9. Лагуновская, Е. В. Эффективность использования различных типов индукционных питательных сред при культивировании пыльников гексаплоидного тритикале / Е. В. Лагуновская, О. И. Зайцева, В. А. Лемеш. – Факторы экспериментальной эволюции организмов: Сб. науч. трудов. – Национальная академия наук Украины, Институт молекулярной биологии и генетики, Укр. о-во генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова; редкол.: В. А. Кунах (гл. ред.) [и др.]. – К.: Укр. о-во генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова, 2019. – Т. 25. – С. 260–265.
10. Анализ межлинейного полиморфизма и степени гомозиготности линий удвоенных гаплоидов тритикале с помощью микросателлитных маркеров / Е. В. Лагуновская [и др.]. – Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 2. – С. 199–208.
11. Дорохов, Д. Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д. Б. Дорохов, Э. Клоке. – *Генетика*. – 1997. – Т. 33, № 4. – С. 443–450.
12. Assessment of genetic diversity among wheat selected genotypes and local varieties for salt tolerance by using RAPD and ISSR analysis / D. Majeed [et al.]. – *Iraqi Journal of Science*. – 2018. – Vol. 59. – P. 278–286.
13. Khaled, A. Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions / A. G. A. Khaled, M. H. Motawea, A. A. Said. – *J Genet Eng Biotechnol.* – 2015. – Vol 13, № 2. – P. 243–252.
14. The National Center for Biotechnology Information [Electronic resource]. – Mode of access: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_018294505.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_018294505.1). – Date of access: 16.02.2023.
15. TaTGW6-A1, an ortholog of rice TGW6, is associated with grain weight and yield in bread wheat / M. Hanif [et al.]. – *Mol Breed.* – 2016. – Vol. 36. – Art. 1.
16. Natural variation of TaGASR7-A1 affects grain length in common wheat under multiple

cultivation conditions / L. L. Dong [et al.]. – Mol Breed. – 2014. – Vol. 34. – P. 937–947.

17. TaGS-D1, an ortholog of rice OsGS3, is associated with grain weight and grain length in common wheat / Y. Zhang [et al.]. – Mol Breeding. – 2014. – Vol. 34. – P. 1 097–1 107.

18. Specificity of expression of TaCKX family genes in developing plants of wheat and their co-operation within and among organs / H. Ogonowska [et al.]. – PLoS One. – 2019. – Vol. 14, № 4. – Art. e0214239.

19. Mapping quantitative trait loci for peroxidase activity and developing gene-specific markers for TaPod-A1 on wheat chromosome 3AL / J. Wei [et al.]. – Theor Appl Genet. – 2015. – Vol. 128. – P. 2067–2076.

20. Allelic variation at the TaZds-A1 locus on wheat chromosome 2A and development of a functional marker in common wheat / C. Dong [et al.]. – Journal of Integrative Agriculture. – 2012. – Vol. 11, № 7. – P. 1 067–1 074.

21. Development of functional markers for a lipoxygenase gene *TaLox-B2* on chromosome 4BS in common wheat / H. W. Geng. – Crop Science. – 2011. – Vol. 52. – P. 568–576.

22. Association of phytoene synthase *Psy1-A1* and *Psy1-B1* allelic variants with semolina yellowness in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) / K. M. Campos [et al.]. – Euphyti-

ca. – 2015. – Vol. 207. – P. – 109–117.

23. Genetic characterization and expression analysis of wheat (*Triticum aestivum*) line 07OR1074 exhibiting very low polyphenol oxidase (PPO) activity / S. M. Hystad [et al.]. – Theor Appl Genet. – 2015. – Vol. 128. – P. 1 605–1 615.

24. Strong presence of the high grain protein content allele of NAM-B1 in Fennoscandian wheat / J. Hagenblad [et al.]. – Theor. Appl. Genet. – 2012. – Vol. 125. – P. 1 677–1 686.

25. The allelic distribution and variation analysis of the *NAM-B1* gene in Chinese wheat cultivars / X. Chen [et al.]. – J. Integr. Agric. – 2017. – Vol. 16. – P. 1 294–1 303.

26. Cloning and phylogenetic analysis of phytoene synthase 1 (*Psy1*) genes in common wheat and related species / J. Wang [et al.]. – Hereditas. – 2009. – Vol. 146, № 5. – P. 208–256.

27. Определение аллельного состава генов, контролирующих качество зерна у пшеницы и тритикале, с использованием технологии KASP / Е. В. Лагуновская [и др.]. – Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы: материалы V Междунар. науч. конф., Минск, 21–25 ноября 2022 г. – Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2022. – С. 51.

E. V. Lagunovskaya

## EVALUATION OF HOMOZYGOSITY AND THE ALLELIC COMPOSITION OF GENES ASSOCIATED WITH ECONOMICALLY VALUABLE TRAITS IN DOUBLED HAPLOID WHEAT AND TRITICALE LINES

State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: e.antonenko@igc.by

Aiming to determine the homozygosity degree of doubled haploid wheat and triticale lines developed using an induced *in vitro* androgenesis technique, an analysis of the intralinear polymorphism of 71 genotypes (18 wheat lines and 53 triticale lines) was carried out by 13 ISSR loci. Homozygosity for 14 DH wheat lines and 24 DH triticale lines was confirmed. KASP genotyping of selected homozygous lines was carried out by four genes associated with the trait “thousand kernel weight” (*TaTGW6-A1*, *TaGASR7-A1*, *TaGs3-D1* and *TaCKX-D1*) and six genes (*Gps-B1*, *TaPod-A1*, *Zds-A1*, *Lox-B1*, *Psy-A1* and *Ppo-A1*) controlling the quality characteristics of grain. It was shown that all investigated lines carry at least two favourable alleles of the aforementioned genes. Seven wheat genotypes and three triticale genotypes, carrying the complex of favourable alleles, were selected.

**Keywords:** wheat, triticale, *Triticum aestivum*, ×*Triticosecale* Wittm., doubled haploid lines, ISSR loci, KASP, thousand kernel weight, quality grain characteristics.

*Дата поступления в редакцию: 8 февраля 2023 г.*

Е. Л. Романишко, М. Е. Михайлова, А. И. Киреева, Р. И. Шейко

## АЛЬФА-МАННОЗИДОЗ — ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ДЕФЕКТ В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ АБЕРДИН-АНГУССКОГО КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: lenaramanishko@mail.ru

Альфа-маннозидоз (МА) — моногенное летальное аутосомно-рецессивное лизосомальное заболевание абердин-ангусской породы крупного рогатого скота, приводящее к неонатальной смертности телят. Согласно литературным данным, частота гетерозиготных носителей альфа-маннозидоза у абердинов составляла от 2,4% в Австралии до 12,5% в Тасмании. С использованием KASP-технологии нами проведено генотипирование выборки животных для детекции однонуклеотидного полиморфизма (SNP) g.13957949T > C в гене *MAN2B1*, вызывающего альфа-маннозидоз. Скрининг выборки из белорусской популяции абердин-ангусского скота (n = 220 гол.) не выявил животных-носителей мутантного аллеля (MAC) как среди исследованных коров, так и среди быков.

**Ключевые слова:** ДНК-тестирование, генетический дефект, альфа-маннозидоз, *MAN2B1*, KASP, SNP, КРС, абердин-ангусская порода.

### Введение

В настоящее время в Беларуси разводится крупный рогатый скот мясного направления продуктивности следующих пород: абердин-ангусской, лимузинской, герефордской и шаролеизской. Поэтому особый интерес представляет такая скороспелая порода, как абердин-ангусская, в связи с востребованностью получения высококачественной говядины согласно Межгосударственному стандарту ГОСТ 33818-2016 «Мясо. Говядина высококачественная». Благодаря прекрасным акклиматизационным способностям животные данной породы обладают такими ценными качествами, как быстрое физиологическое и хозяйственное созревание, хорошие воспроизводительные способности, а также высокий генетический потенциал по показателям мясной продуктивности [1].

Одной из задач Государственной программы «Аграрный бизнес» на 2021–2025 гг. (утверждена Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 01.02.2021 № 59) является увеличение численности поголовья племенных животных, позволяющее нарастить объемы реализации племенной продук-

ции (материала). Поэтому перед учеными и племенными службами республики наряду с улучшением селекционируемых признаков маточного поголовья и быков-производителей отечественной селекции, встала задача сохранения и совершенствования продуктивных и племенных качеств завезенного скота. Однако искусственный отбор по желательным признакам нередко приводит к тому, что полученные животные оказываются носителями генетических дефектов, приводящих к высокой смертности, снижению репродуктивных функций и снижению качества мяса. Это зачастую приводит к значительным экономическим потерям [2, 3].

Применение современных методов ДНК-тестирования животных позволяет исключить животных-носителей генетических дефектов как в племенных стадах, так и в завозимом в страну семенном материале, полученном от высокопродуктивных быков-лидеров породы. Одной из главных проблем современного животноводства в мире стало снижение фертильности. Значительную роль в снижении воспроизводительных качеств коров играют рецессивные мутации в последовательности

ДНК, которые в гомозиготном состоянии могут быть летальными и приводить к эмбриональным потерям. Абердин-ангусская порода не стала исключением, у животных этой породы, как и у всех мясных пород зарубежной селекции, выявлены генетические дефекты, проявление которых связано со снижением фертильности коров [4–6]. Одним из таких дефектов является альфа-маннозидоз (Alpha-mannosidosis, MA) [7].

Альфа-маннозидоз — моногенное летальное аутосомно-рецессивное лизосомальное заболевание, вызванное дефицитом фермента лизосомальная альфа-маннозидаза (MAN2B1) или лизосомальная экзогликозидаза, участвующая в упорядоченной деградации N-связанных олигосахаридов [8]. Данное заболевание выявлено у человека [9], крупного рогатого скота [10], кошек [11] и морских свинок [12, 13]. Ген *MAN2B1* кодирует полипептид, который подвергается посттрансляционной модификации в эндоплазматическом ретикулуме. Во время созревания и эндосомального транспорта белка MAN2B1 в лизосомы он протеолитически расщепляется на три основных полипептида, получивших названия «abc», «d» и «e» и имеющих молекулярную массу 70, 42 и 15 кДа соответственно. В ходе дальнейшего процессинга субъединицы массой 70 кДа образуется в общей сложности пять различных полипептидов. Наиболее высокие уровни экспрессии *MAN2B1* отмечаются в легких, почках, поджелудочной железе, лейкоцитах и спинном мозге. Мутации в гене *MAN2B1* приводят к нарушению функции кодируемого им фермента, что влечет за собой уменьшение расщепления гликопротеинов, к прогрессирующему накоплению богатых маннозой олигосахаридов во всех тканях, и к нарушению нормальной функции клеток и их апоптозу. В зависимости от характера мутации гена *MAN2B1* патологически измененный белок MAN2B1 обнаруживается во внутриклеточных компартментах, таких как эндоплазматический ретикулум и лизосомы. Например, может быть нарушена конформация белка, при которой он «застревает» в эндоплазматическом ретикулуме, если же конформация белка не нарушается, то он транспортируется в неактивном виде в лизосомы [14].

У крупного рогатого скота абердин-ангусской породы альфа-маннозидоз (OMIA: 000625-9913) относится к дефектам I класса, которые являются летальными и существенно нарушают или снижают репродуктивные показатели животного и приводят к неонатальной смертности телят [15, 16]. У крупного рогатого скота альфа-маннозидоз обусловлен однонуклеотидной несинонимичной заменой тимина на цитозин в кодирующей области гена *MAN2B1* в 7 хромосоме (7:g.13957949, c.961T > C, p.Phe321Leu) [17]. Замена фенилаланина на лейцин в 321 положении приводит к образованию функционально неактивного белка. Дефицит  $\alpha$ -D-маннозидазы приводит к глобальным нарушениям обмена веществ у крупного рогатого скота. Гомозиготные по мутантному аллелю телята рождаются без признаков физических недостатков. Затем в течение первого года жизни развиваются прогрессирующие неврологические нарушения: атаксия, головокружение, тремор, агрессия и предсмертный паралич. Клинические проявления связаны с накоплением богатых маннозой соединений, вызванных дефицитом фермента альфа-маннозидазы [16–21].

В связи с высокой частотой встречаемости в мировой популяции ангусов мутантного аллеля гена *MAN2B1*, существует риск распространения данной патологии и среди абердин-ангусского скота в Беларуси. Согласно Положению о порядке проведения молекулярно-генетической экспертизы племенной продукции государств — членов Евразийского экономического союза (№ 74 от 02.06.2020 г.), рекомендовано проводить исследование биологического материала животных абердин-ангусской породы на выявление генетически детерминированных заболеваний, в том числе на альфа-маннозидоз. Поэтому целью нашего исследования является разработка ДНК-технологии выявления мутантного аллеля гена *MAN2B1*, детерминирующего альфа-маннозидоз и выявление животных-носителей данного генетического дефекта в белорусской популяции абердин-ангусского скота.

### Материалы и методы

Объектом исследования являлся крупный рогатый скот абердин-ангусской породы. Материалом для исследования служила

ДНК, выделенная из биологического материала — цельной крови, проб ткани (ушной выщип) и спермы. Выделение ДНК проводили набором реагентов «Нуклеосорб» («Прайм-тех», Беларусь). Количество выделенной ДНК определяли с помощью флуориметра DeNovix DS 11 FS с использованием набора реагентов

для измерения концентрации ДНК DeNovix dsDNA Broad Range Kit (DeNovix, США). Для ДНК-идентификации альфа-маннозидоза абердин-ангусского крупного рогатого скота были использованы следующие методы: KASP и секвенирование по Сэнгеру для валидации метода (табл. 1).

**Таблица 1**

ДНК-идентификация наследственного заболевания у абердин-ангусского скота

Наследственное заболевание	Ген	Хромосома	Локализация	Тип мутации	Метод
Альфа-маннозидоз (МА)	<i>MAN2B1</i>	7	13957949	961T > C (Phe321Leu)	KASP

*KASP-анализ (конкурентная аллель-специфичная ПЦР)*

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь для ПЦР в объеме 10 мкл содержала: ×2 KASP Мастер Микс, смесь специфических праймеров (KASP Assay mix), деионизированную MQ-H<sub>2</sub>O и 25 нг геномной ДНК.

Полимеразную цепную реакцию проводили по программе: 94 °C — 15 мин; 94 °C — 20 сек, 60 °C — 1 мин ((со снижением каждого цикла на 0,6 °C) 10 циклов); 94 °C — 20 сек, 55 °C — 60 сек (26 циклов).

Анализ и учет полученных результатов ПЦР осуществляли с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro.

Двуаллельная дискриминация достигается за счет конкурентного связывания двух аллель-специфических прямых праймеров. Дискриминацию аллелей для определения генотипов проводили по значениям RFU (относительные единицы флуоресценции) для каналов FAM и HEX (табл. 2).

Технология KASP позволяет значительно сократить время проведения анализа, что выгодно отличает его от традиционного ПЦР-ПДРФ анализа.

**Таблица 2**

Последовательность нуклеотидов исследуемого локуса гена *MAN2B1*

Ген	Последовательность ДНК	FAM Аллель	HEX Аллель
<i>MAN2B1</i>	TGCAGGGTAAGCTCTACCGCACCAAACACACTGTGATGACCATGGGC TCAGAC[T/C]TCCAGTACGAGAATGCCAACACGTGGTTCAAAAATCTTGACAAGCTCATCCAGTTGGTCAATGCCAGGTGAGT	C	T

*Секвенирование по Сэнгеру*

Методом прямого секвенирования последовательности ДНК проверена специфичность полученных фрагментов гена *MAN2B1*. Дизайн праймеров для получения специфичных фрагментов гена *MAN2B1* длиной 157 п. н. осуществлялся с помощью программы Primer 3. Анализ нуклеотидной последовательности данного гена проводили с

помощью Ensembl в форматах FASTA. Реакционная смесь для ПЦР в 20 мкл содержала: 10× ПЦР буфер («Thermo Scientific», Литва), 2 ед. Taq-полимеразы («Thermo Scientific», Литва), 2 mM MgCl<sub>2</sub> («Thermo Scientific», Литва), 0.2 mM dNTPs («Thermo Scientific», Литва), 0.5 μM каждого праймера, MQ-H<sub>2</sub>O и по 20 нг геномной ДНК для каждого образца. Программа амплификации: 95 °C — 5 мин;

95 °С — 30 сек, 65 °С — 40 сек, 72 °С — 50 сек, 72 °С — 40 сек, 72 °С — 1 мин (35 циклов).

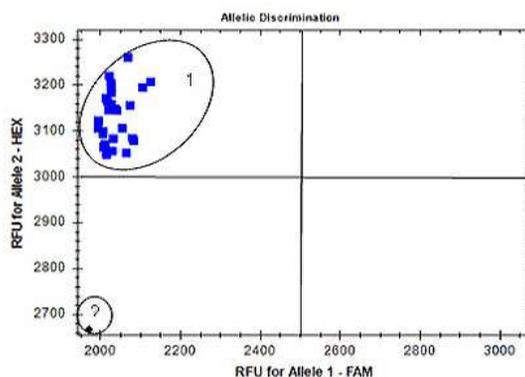
ПЦР-продукты контрольных образцов изучаемого локуса гена вырезали из геля и очищали с помощью набора реагентов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («Thermo scientific», Литва). Для постановки секвенирующей ПЦР использовали Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Секвенирующую ПЦР проводили согласно следующим условиям: 96 °С — 1 мин; 25 циклов: 96 °С — 10 сек, 50 °С — 5 сек, 60 °С — 4 мин; 16 °С — 5 мин. ПЦР-продукты после секвенирующей ПЦР очищали от непрореагировавших флуоресцентно меченых терминаторных нуклеотидов

переосаждением этанолом/Na<sub>2</sub>ЭДТА. Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

### Результаты исследования

С помощью разработанной нами методики была исследована выборка (n = 220 гол.) крупного рогатого скота абердин-ангусской породы 3-х популяций Гомельской (n = 31 гол.), Минской (n = 70 гол.) и Брестской (n = 119 гол.) областей Республики Беларусь. Визуализация результатов KASP-анализа представлена на рисунке 1.

Согласно рекомендации American Angus



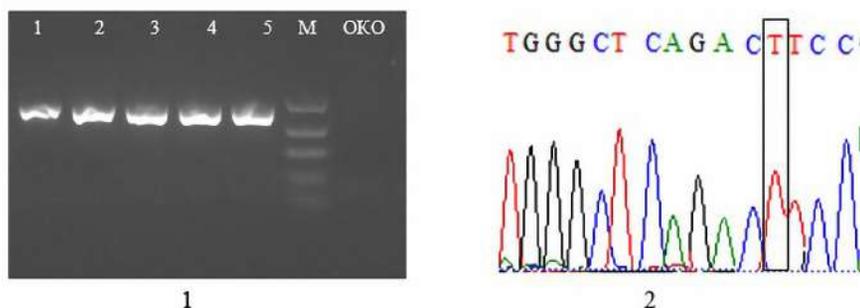
**Рис. 1.** Дискриминация аллелей однонуклеотидного полиморфизма 961T > C в гене *MAN2B1* с использованием технологии KASP-генотипирования: 1 кластер — особи с генотипом ТТ (MAF); 2 — контроль без матрицы (NTC)

Association, животных с аллелями дикого типа гена *MAN2B1* обозначают MAF (свободные от мутации, здоровые). Животных-носителей мутантного аллеля в гетерозиготе обозначают MAC (носители мутации). Не жизнеспособных животных, носителей 2-х мутантных аллелей в гомозиготе, обуславливающих наследственное заболевание альфа-маннозидоз,

обозначают МАА [16].

Генотипирование контрольных образцов показало полное совпадение результатов, полученных с помощью метода KASP-анализа и секвенирования по Сэнгеру (рис. 2).

Животными-носителями альфа-маннозидоза (MAC) могут быть как быки, так и коровы, которые ничем не отличаются от здоровых



**Рис. 2.** Результаты секвенирования: 1 (1–5 — ПЦР фрагмент референсных образцов для секвенирования локуса гена *MAN2B1*, М — маркер молекулярной длины, DNA Ladder SM1103 («Thermo scientific», EU); OKO — отрицательный контрольный образец), 2 — гомозиготное здоровые животное (MAF)

животных (MAF). Ранее генотипирование крупного рогатого скота абердин-ангусской породы в Республике Беларусь не проводилось и, соответственно, отсутствовали данные о наличии генетического дефекта МА в белорусской популяции. Нами исследована выборка абердин-ангусского скота, отобранного из племенных хозяйств республики (табл. 3).

Согласно исследованию Nealy P. J. с соавторами, частота гетерозиготных носителей альфа-маннозидоза у абердинов

составляла 5,4% в Австралии [23]. Исследование Tollersrud O. K. и соавторов установило частоту гетерозиготных носителей альфа-маннозидоза у абердинов, которая составляла от 2,4% в Австралии до 12,5% в Тасмании [22]. Согласно исследованию Jolly R. D. с соавторами примерно 10% ангусов в Новой Зеландии были гетерозиготны по альфа-маннозидозу до начала массового генотипирования животных [24]. Высокая частота встречаемости животных-носителей мутантного аллеля ис-

Таблица 3

Результаты ДНК-тестирования выборки из популяции абердин-ангусского крупного рогатого скота ( $n = 220$  гол.) для выявления животных-носителей мутантного аллеля гена *MAN2B1*, вызывающего альфа-маннозидоз (МА)

Область	Хозяйство	Количество протестированных животных, гол.			Частота свободных от мутации здоровых животных (MAF), %			Частота животных-носителей мутантного аллеля (MAC), %		
		Всего	Быков	Коров	Всего	Быков	Коров	Всего	Быков	Коров
Гомельская	Агро-Лясковичи	31	15	16	100	100	100	–	–	–
Минская	Трайпл-Агро	7	–	7	100	–	100	–	–	–
	КФХ «Весна-агро»	63	32	31	100	100	100	–	–	–
Брестская	Агро-Мотоль	119	–	119	100	–	100	–	–	–

следуемого локуса гена *MAN2B1* в популяциях ангусов разных стран и наличие животных-носителей в родословной лидеров быков-производителей этой породы подтверждает необходимость проведения молекулярно-генетического тестирования племенных животных, завозимых в республику. На данном этапе не выявлено животных-носителей (MAC), несущих мутантный аллель гена *MAN2B1* как среди быкопроизводящих коров, так и среди быков-производителей. Дальнейшее ДНК-типирование расширенного поголовья абердин-ангусского крупного рогатого скота позволит дать более полные данные о распространении генетического дефекта альфа-маннозидоз в поголовье абердин-ангусского скота в Республике Беларусь.

### Заключение

До недавнего времени в республике не было возможности проводить ДНК-тестирование на выявление генетических дефектов у абердин-ангусского крупного рогатого скота, а также завозимого племенного материала (животных, эмбрионов, спермы). Поэтому страна находилась в зоне риска появления и распространения генетических дефектов в популяции мясного скота. Как известно, возникновение генетических дефектов легче не допустить, чем впоследствии бороться с аномалиями, которые могут привести к серьезным экономическим потерям. Животные, в родословных которых один из родителей является носителем МА, обязательно должны быть генотипированы.

Разработанная нами методика обнаружения мутантного аллеля гена *MAN2B1*, вызывающего альфа-маннозидоз, позволяет проводить молекулярно-генетическую экспертизу племенной продукции в Республике Беларусь в порядке, установленном международно-правовыми актами, составляющими право Евразийского экономического союза, с целью профилактики распространения данного летального аутосомно-рецессивного заболевания среди племенных животных абердин-ангусской породы крупного рогатого скота.

*Работа выполнена при финансовой поддержке ГП «Наукоемкие технологии и техника» на 2021–2025 гг., подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии–2020», мероприятие 2ИБ «Разработать ДНК-технологии идентификации полиморфных вариантов генов, влияющих на репродуктивные признаки, с целью повышения воспроизводительной способности КРС мясного направления».*

#### Список использованных источников

1. Мясное скотоводство в Беларуси: перспективы развития / С. А. Гордынец, Л. П. Шалушкова, И. С. Петрушко [Электронный ресурс]. – Интернет журнал Продукт ВУ. – Режим доступа. <https://produkt.by/story/myasnoscotovodstvo-v-belarusi-perspektivy-razvitiya>.
2. Грибов А. В. Перспективы развития специализированного мясного скотоводства в республике Беларусь [Электронный ресурс]. – Научная электронная библиотека. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/perspektivy-razvitiya-spetsializirovannogo-myasnogo-skotovodstva-v-respublike-belarus>.
3. Эрнст, Л. К. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупномасштабной селекции / Л. К. Эрнст, А. И. Жигачев. – М., Россельхозакадемия, СпбГАВМ. – 2006.
4. Жигачев, А. И. О накоплении груза мутаций в породах крупного рогатого скота при интенсивных технологиях воспроизводства и улучшения по целевым признакам / А. И. Жигачев, Л. К. Эрнст, А. С. Богачев. – Сельскохозяйственная апология. – 2008. – № 6. – С. 25–32.
5. Зиновьева, Н. А. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве / Н. А. Зиновьева, Н. И. Стрекозов, А. А. Сермягин. – Генетические ресурсы ОАО «Московское» по племенной работе изд. третье. – М.: ОАО «Московское» по племенной работе». – 2015. – С. 19–21.
6. Жигачев, А. И. Оценка производителей на скрытые генетические дефекты / А. И. Жигачев. – Зоотехния. – 2001. – № 2. – С. 10–12.
7. [Электронный ресурс] <https://www.angus.org/>.
8. Aronson N. N, Kuranda M. J. 1991. Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins. – FASEB J. – № 3. – P. 2 615–2 622.
9. Mannosidosis. In: Durand / Chester MA, Lundblad A, Ockerman P-A, et al. – Genetic errors of glycoprotein metabolism Edi-Ermes., Milan. – 1982. – P. 89 –122.
10. Hocking J. D., Jolly R. D., Batt R. D. Deficiency of  $\alpha$ -mannosidase in Angus cattle. An inherited lysosomal storage disease / Hocking J. D., Jolly R. D., Batt R. D. – Biochem J. – 1972. – № 128. – P. 69–78.
11. Biochemical studies on a case of feline mannosidosis / Burditt L. J., Chotai K., Hirani S. et al. – Biochem J. – 1980. – № 189. – P. 467–473.
12. Muntz F. H., Bonning L. E., Carey W. F. Alpha-mannosidosis in a guinea pig / F. H. Muntz, L. E. Bonning, W. F. Carey. – Lab Anim Sci. – 1999. – № 49. – P. 424–426.
13. Identification of 83 Novel Alpha-Mannosidosis-Associated Sequence Variants: Functional Analysis of MAN2B1 Missense Mutations / H. M. Frostad, R. Sensland, H. B. Klenow, L. V. Nguyen, et al. – Human mutation. – 2012. – Vol. 33, № 3. – P. 511–520.
14. [Электронный ресурс] <https://www.alpha-mannosidosis.com/ru/для-специалистов-здравоохранения/информация-о-заболевании/механизм-развития-заболевания/>.
15. [Электронный ресурс] <https://www.omia.org/OMIA000625/9913/>.
16. [Электронный ресурс] <https://www.vgnki.ru/assets/files/broshyura-o-testah-aberdingusskoj-porody.pdf>.
17. Тестирование на носительство наследственных заболеваний крупного рогатого скота абердин-ангусской породы. – Брошюра Министрство сельского хозяйства Российской Федерации Россельхознадзор Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский Государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»).

18. Konovalova E. N. Genetic defects of beef cattle and necessity of their managing. – RJOAS. – 2017. – № 8 (68). – P. 254 – 259.
19. Коновалова Е. Н., Костюнина О. В. Распространение генетических дефектов множественного артрогрипоза (АМ) и дубликации развития (DD) среди российских популяций крупного рогатого скота абердин-ангусской породы. *Генетика и разведение животных*. – 2019. – № 1. – С. 16–21.
20. [Электронный ресурс] <http://www.flockandherd.net.au/cattle/reader/developmental-duplication-angus.html>.
21. [Электронный ресурс] [https://redangus.org/wp-content/uploads/2018/02/Alpha-Mannosidosis\\_FAQ.pdf](https://redangus.org/wp-content/uploads/2018/02/Alpha-Mannosidosis_FAQ.pdf).
22. Purification of bovine lysosomal alpha-mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations that cause alpha-mannosidosis / Tollersrud O. K., Berg T., Healy P., Evjen G., Ramachandran U., Nilssen O. – *Eur J Biochem*. – 1997. – Jun № 1; 246(2). – С. 410–419.
23. Control of  $\alpha$ -mannosidosis in Angus cattle / P. J. Healy, P. J. Babidge, D. H. Embury et al. – *Australian Veterinary Journal*. – 2008. – № 60(5). – P. 135–137.
24. Identification of mannosidosis heterozygotes-factors affecting normal plasma alpha-mannosidase levels. R. D. Jolly, K. G. Thompson, C. A. Tse. – *New Zealand Veterinary Journal*. – 1974. – Vol. 22. – P. 155–162.

**E. L. Ramanishka, M. E. Mikhailova, A. I. Kireyeva, R. I. Sheyko**

## **ALFA-MANNOSIDOSIS — A GENETIC DEFECT IN THE BELARUSIAN ABERDEEN ANGUS CATTLE POPULATION**

State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: lenaramanishko@mail.ru

Alpha-mannosidosis (MA) is a monogenic lethal, autosomal recessive, lysosomal disease of Aberdeen Angus cattle leading to neonatal mortality in calves. According to the literature, the frequency of heterozygous carriers of alpha mannosidosis in Aberdeens ranged from 2.4% in Australia to 12.5% in Tasmania. Using KASP technology, the single nucleotide polymorphism (SNP) g.13957949T > C in the *MAN2B1* gene causing alpha-manasidosis was investigated. Screening of a sample from the Belarusian population of Aberdeen Angus cattle (n = 220 heads) did not reveal any animals carrying a mutant allele (MAC) — neither among the cows nor among the bulls studied.

**Keywords:** DNA testing, genetic defect, alpha-mannosidosis, *MAN2B1*, KASP, SNP, cattle, Aberdeen Angus breed.

*Дата поступления в редакцию: 06 февраля 2023 г.*

В. А. Лемеш<sup>1</sup>, В. Ю. Агеев<sup>2</sup>, А. И. Царь<sup>1</sup>, М. С. Парфенчик<sup>1</sup>, В. Н. Кипень<sup>1</sup>, Т. А. Сергеева<sup>2</sup>

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПЛЕМЕННОГО РЕМОНТНО-МАТОЧНОГО СТАДА АМУРСКОГО САЗАНА *CYPRINUS CARPIO HAEMATOPTERUS*, ВЫРАЩИВАЕМОГО В АКВАКУЛЬТУРЕ В БЕЛАРУСИ

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: v.lemesh@igc.by

<sup>2</sup>Республиканское дочернее унитарное предприятие «Институт рыбного хозяйства»  
Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр  
Национальной академии наук Беларуси по животноводству»,  
Республика Беларусь, 220024, г. Минск, ул. Стебенева, 22

Дана оценка генетического разнообразия племенного ремонтно-маточного стада амурского сазана *Cyprinus carpio haematopterus*, выращиваемого в аквакультуре в Беларуси, с использованием 14-ти микросателлитных локусов. Для двух выборок 2021 и 2022 гг. рассчитаны показатели: среднее число аллелей на локус ( $N_a$ ), эффективное число аллелей ( $N_e$ ), уровни ожидаемой ( $H_e$ ) и наблюдаемой ( $H_o$ ) гетерозиготности, значение информационного индекса Шеннона ( $I$ ) и индексы фиксации  $F_{IS}$  и  $F_{ST}$ . Установлено, что выборка 2 превосходит выборку 1 по количеству выявленных аллелей, однако по числу эффективных аллелей уступает выборке 1. Выявлено снижение генетического разнообразия в выборке 1 по сравнению с выборкой 2. Показатель наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) в обеих выборках соответствует таковому для особей, обитающих в естественных условиях. Выявлено 5 локусов, обладающих наибольшим дифференцирующим потенциалом. Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком генетическом разнообразии искусственных популяций амурского сазана, разводимого в аквакультуре в Беларуси, что дает возможность оптимизировать процессы поддержания ремонтно-маточного стада и подбора пар для гибридизации, а также выявлять перспективных производителей для участия в селекционных программах.

**Ключевые слова:** амурский сазан, *Cyprinus carpio haematopterus*, генетическое разнообразие, микросателлитные локусы.

### Введение

В селекционных программах по выведению новых пород карпа самцов амурского сазана *Cyprinus carpio haematopterus* используют в качестве отцовского компонента для гибридизации с карпом и получения гетерозисного эффекта при промышленном выращивании гибридов первого поколения. При проведении комплексной оценки пищевой ценности амурского сазана и карпа разной породной принадлежности отмечается среднее положение амурского сазана среди пород карпа коллекционного стада. Амурский сазан характеризуется сравнительно низким значением коэффициента упитанности и обхвата тела и в сравнении с карпом имеет сниженные темпы роста, однако отлича-

ется высокой комбинационной способностью, выживаемостью и повышенной резистентностью к основному заболеванию карповых рыб — воспалению плавательного пузыря.

Недавние исследования показали, что в «одомашненных» популяциях европейских и азиатских пород карпа генетическое разнообразие в сравнении с дикими популяциями значительно ниже [1]. Потеря изменчивости в закрытых популяциях может возникать во время становления (эффект основателя) и в последующих поколениях посредством генетического дрейфа, возникающего из-за первоначально небольшого числа особей. О негативном влиянии разведения в неволе свидетельствует значительное снижение ге-

нетической изменчивости у культивируемого карпа в «одомашненные» популяции [1]. Поскольку амурский сазан, выращиваемый в аквакультуре, является исходным родительским видом в скрещиваниях при выведении новых пород карпа, необходимо изучение его генетического разнообразия с целью выведения из ремонтно-маточного стада и гибридизации особей с относительно невысоким генетическим разнообразием, и, следовательно, обогащения генофонда коллекционных стад карпа, поддерживаемых в аквакультуре в Беларуси.

Цель исследования — оценить генетическое разнообразие племенного ремонтно-маточного стада амурского сазана *Cyprinus carpio haematopterus*, выращиваемого в аквакультуре в Беларуси, с использованием 14-ти микросателлитных маркеров.

### Материалы и методы

Материалом для исследований служили биологические образцы (плавники) 30 особей амурского сазана выборки 2021 г. (выборка 1) и 50 особей амурского сазана выборки 2022 г. (выборка 2). Выборка 1 представлена особями второй генерации 9 поколения амурского сазана, разводимого в аквакультуре в Беларуси. Выборка 2 представляет собой опытную группу третьей генерации, полученную с использованием молок амурского сазана, завезенного из Российской Федерации с целью расширения генетического разнообразия маточного стада. ДНК выделена из биологических образцов с помощью методики, в которой используется фенол-хлороформная смесь [2].

Генетическое разнообразие оценивали по четырнадцати SSR-локусам (англ. simple sequence repeats; сокр. — SSR) — MFW1, MFW2, MFW6, MFW9, MFW10, MFW11, MFW13, MFW16, MFW20, MFW24, MFW26, MFW28, MFW29 и Cid0909 [3, 4].

Определение размеров ампликонов осуществлялось путем капиллярного гель-электрофореза на приборе с высокой разрешающей способностью ABI 3500 Genetic Analyzer, который, считывая флуоресцентный сигнал, определял размер фрагмента в сравнении с размерным стандартом Orange 500 DNA Size Standard (Nimagen, Нидерланды). Обработка полученного массива данных проводилась с использованием ПО GeneMapper Software v5.

Статистический анализ данных проводили с использованием программ GenAlEx v.6.5 [5], PAST v.3.17 [6]. Рассчитаны показатели, характеризующие генетическую структуру популяции амурского сазана:

Na (количество выявленных аллелей на локус) — показатель, который позволяет оценить аллельное разнообразие в популяции, основываясь на общем числе выявленных вариантов;

Ne (количество эффективных аллелей) — показатель, который характеризует распространенность аллелей, которые теоретически необходимы для достижения той же ожидаемой гетерозиготности, что и в изучаемой популяции; позволяет определить разнообразие с учетом частоты встречаемости аллелей по конкретному локусу;

He (ожидаемая гетерозиготность) — показатель, который описывает долю гетерозиготных генотипов, ожидаемых в равновесии Харди-Вайнберга [7];

Ho (наблюдаемая гетерозиготность) — показатель изменчивости (полиморфности) популяции, который описывает долю гетерозиготных генотипов в эксперименте [7];

I (индекс разнообразия Шеннона) — количественная мера, которая отражает, сколько различных типов (например, субпопуляций) имеется в наборе данных (популяции); индекс позволяет произвести статистическую оценку выборок и оценить значимость различий между уровнями разнообразия; может принимать значение от 0 до 5 [8];

$F_{IS}$  (индивидуальный индекс фиксации) позволяет оценить степень родственного спаривания особей в субпопуляции, отражает отклонения генотипических частот с точки зрения недостатка (принимает значение от 1 до 0) или избытка (принимает значение от 0 до -1) гетерозигот [9].

$F_{ST}$  (индекс фиксации) характеризует снижение гетерозиготности из-за ограничения миграции и генетического дрейфа между субпопуляциями и указывает на степень дивергенции субпопуляций с течением времени [9].

С использованием GenAlEx v.6.5 рассчитаны генетические дистанции по методу AMOVA. В программе PAST v.3.17 выполнено построение графика главных компонент на основе расчета генетических дистанций по методу AMOVA.

### Результаты и обсуждение

Для выборки 1 амурского сазана в 14-ти исследованных SSR-локусах идентифицировали 212 аллелей, в том числе 119 редких (с частотой встречаемости менее 5,0%), что составляет 56% от общего количества выявленных аллелей. Количество выявленных аллелей (Na) в исследованных локусах варьировало от 10 до 21, среднее значение —  $15,143 \pm 3,278$ . Наибольшее число аллелей представлено по локусу MFW11 (табл. 1). Число эффективных аллелей (Ne) в локусах варьировало от 4,286 (локус MFW2) до 12,676 (MFW11), среднее значение —  $7,808 \pm 2,573$ . Индекс биоразнообразия Шеннона (I), рассчитанный для совокупности 14-ти SSR-локусов, составил  $2,284 \pm 0,284$  (табл. 1), что указывает на среднюю сложность структуры популяции

амурского сазана выборки 1 [10].

Наибольшее значение показателя ожидаемой гетерозиготности (He) выявлено для локуса MFW11 (0,921), наименьшее — для локуса MFW2 (0,767), при среднем значении  $0,859 \pm 0,045$  (табл. 1). Наибольшее значение показателя наблюдаемой гетерозиготности (Ho) отмечено для локусов MFW9 и MFW1 (0,800), наименьшее — для локуса MFW28 (0,310), при среднем значении  $0,635 \pm 0,133$  (табл. 1).

Наибольшее значение индивидуального индекса фиксации ( $F_{is}$ ) отмечено для локуса MFW28 (0,626), наименьшее — для локуса MFW9 (0,032), при среднем значении  $0,262 \pm 0,148$  (табл. 1).

Для выборки 2 амурского сазана в 14-ти исследованных SSR-локусах идентифицировали

**Таблица 1**

Генетическая характеристика амурского сазана выборки 1 по 14 SSR-локусам

SSR-локус	Na	Ne	I	He	Ho	$F_{is}$
MFW 1	14	8,571	2,343	0,883	<b>0,800</b>	0,094
MFW 2	12	<b>4,286</b>	1,860	<b>0,767</b>	0,600	0,217
MFW 6	16	12,245	2,613	0,918	0,700	0,238
MFW 9	13	5,769	2,059	0,827	<b>0,800</b>	<b>0,032</b>
MFW 10	13	6,250	2,127	0,840	0,533	0,365
MFW 11	<b>21</b>	<b>12,676</b>	2,758	<b>0,921</b>	0,600	0,349
MFW 13	20	9,231	2,566	0,892	0,667	0,252
MFW 16	17	7,692	2,377	0,870	0,700	0,195
MFW 20	17	9,890	2,538	0,899	0,633	0,295
MFW 24	10	5,600	1,947	0,821	0,643	0,217
MFW 26	14	7,258	2,235	0,862	0,667	0,227
MFW 28	16	5,861	2,153	0,829	<b>0,310</b>	<b>0,626</b>
MFW 29	18	8,780	2,481	0,886	0,767	0,135
Cid0909	11	5,202	1,914	0,808	0,467	0,422
Среднее значение	15,143	7,808	<b>2,284</b>	0,635	0,859	0,262
Стандартное отклонение	3,278	2,573	0,284	0,133	0,045	0,148

220 аллелей, в том числе 119 редких, что составляет 60,8% от общего количества выявленных аллелей. Количество выявленных аллелей (Na) в исследованных локусах варьировало от 7 до 24, среднее значение —  $15,714 \pm 5,690$ . Наибольшее число аллелей представлено по маркерным локусам MFW11 и MFW20 (табл. 2). Число эффективных аллелей (Ne) в локусах варьировало от 2,778 (MFW6) до 15,060 (MFW11), среднее значение —  $7,647 \pm 3,251$ . Индекс биоразнообразия Шеннона (I) составил  $2,234 \pm 0,465$  (табл. 2), что указывает на среднюю сложность структуры популяции амурского сазана выборки 2 [10].

Наибольшее значение показателя ожидаемой гетерозиготности (He) выявлено для локуса MFW11 (0,934), наименьшее — для локуса MFW6 (0,640), при среднем значении

$0,840 \pm 0,084$  (табл. 2). Наибольшее значение показателя наблюдаемой гетерозиготности (Ho) отмечено для локуса Cid0909 (0,898), наименьшее — для локуса MFW24 (0,380), при среднем значении  $0,687 \pm 0,166$ .

Наибольшее значение индивидуального индекса фиксации ( $F_{is}$ ) отмечено для локуса MFW24 (0,518), наименьшее — для локуса MFW10 ( $-0,284$ ), при среднем значении  $0,170 \pm 0,238$  (табл. 2).

Проведен сравнительный анализ данных научных исследований, посвященных оценке генетического разнообразия популяций европейских и азиатских пород биологического вида *Cyprinus carpio haematopterus*, особи которого обитают в естественных условиях или в аквакультуре [11, 12, 13], и особями, разводимыми в аквакультуре в Беларуси (табл. 3).

Таблица 2

Генетическая характеристика амурского сазана выборки 2 по 14 STR-локусам

SSR-локус	Na	Ne	I	He	Ho	$F_{is}$
MFW 1	16	8,475	2,421	0,882	0,840	0,048
MFW 2	14	8,306	2,355	0,880	0,820	0,068
MFW 6	7	<b>2,778</b>	1,375	<b>0,640</b>	0,700	-0,094
MFW 9	17	8,547	2,438	0,883	0,880	0,003
MFW 10	8	3,177	1,412	0,685	0,880	<b>-0,284</b>
MFW 11	<b>24</b>	<b>15,060</b>	2,896	<b>0,934</b>	0,600	0,357
MFW 13	14	6,321	2,104	0,842	0,460	0,454
MFW 16	20	6,821	2,431	0,853	0,700	0,180
MFW 20	<b>24</b>	10,425	2,753	0,904	0,563	0,378
MFW 24	7	4,744	1,674	0,789	<b>0,380</b>	<b>0,518</b>
MFW 26	19	5,981	2,225	0,833	0,680	0,183
MFW 28	19	9,398	2,517	0,894	0,700	0,217
MFW 29	19	10,846	2,588	0,908	0,520	0,427
Cid0909	12	6,180	2,088	0,838	<b>0,898</b>	-0,071
Среднее значение	15,714	7,647	<b>2,234</b>	0,687	0,840	0,170
Стандартное отклонение	5,690	3,251	0,465	0,166	0,084	0,238

**Таблица 3**

Генетическая характеристика популяций амурского сазана по SSR-локусам

Страна / популяция	SSR	Na	Ho	Ссылка	
Беларусь / Выборка 1*	14	15,143	0,859		
Беларусь / Выборка 2*	14	15,714	0,84		
Вьетнам / SOL*	4	9,50	0,71	[11]	
Вьетнам / YEB*	4	9,50	0,75		
Вьетнам / TBR**	4	9,50	0,80		
Вьетнам / BAK*	4	9,25	0,82		
Вьетнам / THN*	4	9,00	0,70		
Вьетнам / RER*	4	11,00	0,83		
Вьетнам / LOR**	4	10,75	0,82		
Вьетнам / BGR*	4	10,00	0,82		
Вьетнам / SOR**	4	9,50	0,81		
Вьетнам / DAL*	4	9,25	0,82		
Вьетнам / LAR**	4	8,75	0,83		
Китай / HX*	20	5,80	0,75		[12]
Китай / CZ**	20	7,00	0,76		
Китай / LC*	20	5,85	0,68		
Китай / JZ*	20	7,25	0,68		
Китай / WX*	20	5,85	0,68		
Китай / WK*	20	7,50	0,71		
Китай / XZS*	20	7,75	0,70		
Китай / BL*	20	9,65	0,76		
Китай / DRY*	20	1,62	0,70		
Китай / MA*	20	10,40	0,72		
Польша / Polish strain Zator*	11	5,64	0,59	[13]	
Польша / Polish strain 3 (Ochaby strain)*	11	4,73	0,42		
Польша / Polish strain 2 (Landek strain)*	11	4,55	0,51		
Польша / Polish strain K (Knyszyn strain)*	11	4,27	0,44		
Польша / Polish strain 6 (Gołysz strain)**	11	4,27	0,71		
Польша / Polish strain Sobieszyn*	11	3,46	0,50		
Польша / Polish strain Jaktorow**	11	3,36	0,62		

**Примечание.** \* — среднее значение  $F_{IS} > 0$  (в совокупности по всем SSR-локусам); \*\* —  $F_{IS} < 0$  (в совокупности по всем SSR-локусам)

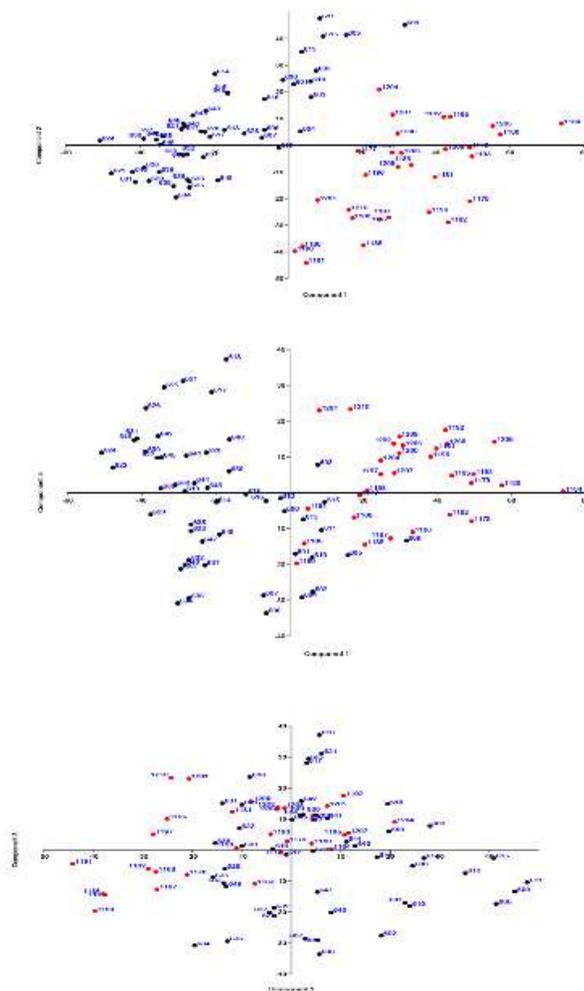
Установлено, что выборки амурского сазана, разводимого в Беларуси, характеризуются наибольшим количеством выявленных аллелей ( $N_a$ ) — 15,143 для выборки 1 и 15,714 для выборки 2. Показатель наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) соответствует таковому для особей, обитающих в естественных условиях [11, 13].

Для иллюстративной генетической характеристики популяции амурского сазана, разводимого в аквакультуре Беларуси, построен график главных компонент (англ. principal component analysis; сокр. — PCA), используя программу PAST v.3.17 (рис. 1): красным цветом обозначены особи амурского сазана из выборки 1, черным — из выборки 2. На рисунке 1 в системе координат PC1 и PC2, объясняющих 33,04% дисперсии, выборки 1 и 2 разнесены друг относительно друга и образуют два неперекрывающихся массива. Это связано с тем,

что выборка 1 представлена особями второй генерации 9 поколения амурского сазана, разводимого в Беларуси, т. е. для нее характерен более высокий уровень инбридинга и она представляет собой гомогенную группу. Выборка 2 представляет собой опытную группу третьей генерации, полученную с использованием молок амурского сазана, завезенного из Российской Федерации, т. е. сопоставляемые выборки различаются по аллельному спектру.

В системе координат PC1 и PC3, объясняющих 13,25% дисперсии, и PC2 и PC3, объясняющих 8,75% дисперсии, выборки частично перекрываются. Это обусловлено тем, что и для выборки 1 и для выборки 2 использовались при разведении самки амурского сазана белорусской популяции.

Для полной генетической характеристики ремонтно-маточного стада амурского сазана,



**Рис. 1.** График главных компонент (PCA) для амурского сазана выборок 2021 и 2022 гг.: PC1 = 33,04%, PC2 = 13,25%, PC3 = 8,75%



**Таблица 5**  
Частота распространенности аллелей для SSR-локусов с наибольшим дифференцирующим потенциалом (по результатам F<sub>ST</sub>) в выборках амурского сазана

Аллель	MFW 10		Аллель	MFW 6		Аллель	Ctd0909		Аллель	MFW 16		Аллель	MFW 26	
	выб. 1	выб. 2		выб. 1	выб. 2		выб. 1	выб. 2		выб. 1	выб. 2		выб. 1	выб. 2
107	0,033		96	0,117		184	0,017		113	0,033		101		0,010
121	0,250	0,100	99	0,067		198	0,017		116	0,017		103	0,067	
126	0,133	0,020	101	0,017	0,560	232	0,033		118	0,017		106		0,010
128		0,460	103	0,083		242	0,067		120		0,020	108		0,030
136	0,033	0,010	111	0,050		250	0,033		124	0,017	0,010	115	0,050	0,030
138	0,017		114	0,033	0,050	263	0,033		126	0,017	0,050	117		0,050
142		0,290	116	0,100	0,060	265	0,167	0,112	128	0,017	0,020	122		0,140
145		0,010	118	0,083		267	0,267		133		0,330	124	0,233	0,030
148	0,017		122	0,050		272	0,067	0,061	135	0,033	0,020	127	0,033	0,180
154		0,090	124	0,067		274	0,283	0,051	137	0,050	0,070	129	0,017	0,010
160	0,083		128	0,017		276		0,316	139	0,017	0,110	131	0,167	
164	0,033		130		0,160	282		0,102	142	0,017	0,010	133	0,083	0,320
169	0,033	0,020	132	0,083		284	0,017	0,133	144		0,010	136	0,017	
177	0,017		134	0,133		287		0,010	150		0,080	139	0,183	0,030
186	0,050		136	0,017	0,010	292		0,031	152		0,040	141	0,017	0,010
202	0,050		138	0,050	0,110	294		0,010	154	0,067		145	0,017	0,030
212	0,250		140	0,033		304		0,071	156		0,020	148	0,017	0,010
			168		0,050	317		0,092	158	0,033	0,060	150		0,010
						327		0,010	161	0,250	0,050	152		0,070
									164	0,033		156		0,010
									166	0,083	0,030	158		0,010
									169	0,183	0,020	160		0,010
									174		0,010	176	0,033	
									176	0,117		191	0,067	
									192		0,020			
									202		0,020			

SSR-локусов для двух выборок, весьма разнообразен. Например, в локусе MFW10 аллель 128 в выборке 2 представлен с частотой 0,460, а в выборке 1 не выявлен. По этому же локусу аллель 212 в выборке 1 представлен с частотой 0,250, а в выборке 2 данный аллель не обнаружен. Таким образом, можно качественно и количественно охарактеризовать аллельный спектр SSR-локусов, выявленный для выборок амурского сазана, разводимого в Беларуси.

### Заключение

Проведен молекулярно-генетический анализ двух выборок амурского сазана из племенного ремонтно-маточного стада, разводимого в аквакультуре в Беларуси, по четырнадцати SSR-локусам — MFW1, MFW2, MFW6, MFW9, MFW10, MFW11, MFW13, MFW16, MFW20, MFW24, MFW26, MFW28, MFW29 и Cid0909. Для выборки 1 идентифицировали 212 аллелей, в том числе 119 редких (с частотой встречаемости менее 5,0%), что составляет 56% от общего количества выявленных аллелей. Для выборки 2 — идентифицировали 220 аллелей, в том числе 119 редких, что составляет 60,8% от общего количества выявленных аллелей. Установлено, что выборка 2 превосходит выборку 1 по количеству выявленных аллелей (средние значения:  $15,714 \pm 5,690$  и  $15,143 \pm 3,278$ ), однако по числу эффективных аллелей уступает выборке 1 (средние значения:  $7,647 \pm 3,251$  и  $7,808 \pm 2,573$ ) соответственно. Расчет индекса фиксации аллелей внутри выборок ( $F_{IS}$ ) позволил выявить увеличение генетического разнообразия в выборке 2 по сравнению с выборкой 1 ( $F_{IS} = 0,170 \pm 0,238$  и  $0,262 \pm 0,148$  соответственно). Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком генетическом разнообразии искусственных популяций амурского сазана. При сравнении данных, представленных в аналогичных исследованиях, посвященных оценке генетического разнообразия популяций европейских и азиатских пород, установлено, что выборки амурского сазана, разводимого в аквакультуре в Беларуси, характеризуются наибольшим числом выявленных аллелей ( $N_a$ ). Показатель наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) для выборки 1 и 2 составил  $0,635 \pm 0,133$  и  $0,687 \pm 0,166$ , что соответствует таковому для особей, обитающих в естественных усло-

виях [11, 12, 13].

Выявлено 5 SSR-локусов, обладающих наибольшим дифференцирующим потенциалом MFW10, MFW6, Cid0909, MFW16 и MFW26 ( $F_{ST} > 0,05$ ,  $p$ -уровень  $< 0,001$ ). На основании рассчитанных генетических дистанций особи амурского сазана из племенного ремонтно-маточного стада формируют две группы, которые, однако, не полностью обособлены друг от друга. Данный результат объясняется, с одной стороны, использованием для разведения самок амурского сазана белорусской популяции в обеих выборках, с другой стороны — отдельным содержанием выборок и внесением новых генотипов в выборку 2 (опытная группа с использованием молок амурского сазана, завезенного из Российской Федерации).

Таким образом, проводимые исследования позволяют выявить перспективных производителей для дальнейшего участия в селекционных программах исходя из высоких показателей гетерозиготности и генетического разнообразия, а также оптимизировать процессы поддержания ремонтно-маточного стада и подбора пар для гибридизации, а также выявлять перспективных производителей для участия в селекционных программах.

### Список использованных источников

1. Kohlmann, K. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations / K. Kohlmann, P. Kerstena and M. Flajšhansb. — *Aquaculture*. — 2005. — Vol. 247. — P. 253–266.
2. Sambrook, J., Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
3. Crooijmans et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) / R. P. M. A Crooijmans [et al.]. — *Animal Genetics*. — 1997. — Vol. 28. — P. 129–134.
4. J. H. Xia et al. A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs / J. H. Xia [et al.]. — *BMC Genomics*. — 2010. — Vol. 11 (135). — P. 2–16.
5. Peakall, R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update / R. Peakall, P. E. Smouse. — *Bioinformatics*. — 2012. — Vol. 28 (19). —

P. 2 537–2 539.

6. Hammer, Ø. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / Ø. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan. – Palaeontologia Electronica. – 2001. – Vol. 4 (1). – P. 1–9.

7. Животовский Л. А. Популяционная биометрия. – М.: Наука. – 1991.

8. Кононов А. В. Генетическое и видовое разнообразие в исходных и инвазивных популяциях комплекса вредителей хвойных деревьев: жук-короед *P. proximus* (Coleoptera, Scolytidae) и его грибы-симбионты. Дис. канд. биол. наук. Новосибирск. – 2018. – 102 с.

9. Кузнецов, В. М. F-Статистики Райта: Оценка и интерпретация / В. М. Кузнецов. – Проблемы биологии продуктивных животных.

– 2014. – № 4 – С. 80–104.

10. Shannon, C. E. An Algebra for Theoretical Genetics; University of Michigan: Ann Arbor, MI, USA, 1936.

11. Binh Thanh Thai et al. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellites loci. – Aquaculture. – 2007. – Vol. 269, I. 1–4. – P. 174–186.

12. Yingying Ye et al/ Genetic Diversity of Fish in Aquaculture and of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) in Traditional Rice-Fish Coculture. – Agriculture. – 2022. – Vol. 12(7). – 997 p.

13. Łukasz Napora-Rutkowskia et al. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains breed in Poland based on microsatellite, AFLP, and mtDNA genotype data. – Aquaculture. – 2017. – Vol. 473. – P. 433–442.

V. A. Lemesh<sup>1</sup>, V. Yu. Ageyets<sup>2</sup>, N. I. Tsar<sup>1</sup>, M. S. Parfenchyk<sup>1</sup>, V. N. Kipen<sup>1</sup>, T. A. Sergeeva<sup>2</sup>

## GENETIC DIVERSITY OF THE AMUR SAZAN *CYPRINUS CARPIO HAEMATOPTERUS* BROODSTOCK GROWN IN THE AQUACULTURE OF BELARUS

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,  
27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus  
e-mail: v.lemesh@igc.by

<sup>2</sup>Republican Daughter Unitary Enterprise “Fish Industry Institute” of the Republican Unitary Enterprise  
“Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Animal Husbandry”  
22 Stebeneva St., 220024 Minsk, the Republic of Belarus

This study aimed to investigate, using 14 microsatellite loci, the genetic diversity of the Amur sazan (*Cyprinus carpio haematopterus*) breeding replacement broodstock being grown in Belarus. For two samples of 2021 and 2022, the following indicators were calculated: the average number of alleles per locus ( $N_a$ ), the effective number of alleles ( $N_e$ ), the levels of expected ( $H_e$ ) and observed ( $H_o$ ) heterozygosity; the value of the Shannon diversity index ( $I$ ) and  $F_{IS}$  and  $F_{ST}$  fixation indices. It was found that sample 2 is superior to sample 1 in terms of the number of alleles identified; however, it is inferior to sample 1 in terms of the number of effective alleles. A decrease in genetic diversity in sample 1 compared to sample 2 was revealed. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) in both samples corresponds to that for individuals living in natural conditions. Five loci with the highest differentiating potential were identified. The results obtained indicate a fairly high genetic diversity of artificial populations of the Amur sazan bred in the aquaculture of Belarus, which makes it possible to optimize the processes of maintaining the replacement broodstock and selecting hybridization pairs, as well as to identify promising producers for breeding programs.

**Keywords:** Amur sazan, *Cyprinus carpio haematopterus*, genetic diversity, microsatellite loci.

Дата поступления в редакцию: 06 февраля 2023 г.

Е. В. Гузенко

## ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЧЕЛОСЕМЕЙ *APIS MELLIFERA* L., РАЗВОДИМЫХ НА ПАСЕКАХ МИНСКОЙ ОБЛАСТИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: e.guzenko@igc.by

В статье представлены данные молекулярно-генетического анализа пчелосемей, разводимых на пасеках Минской области (Беларусь). Определены информативные SSR-маркеры, позволяющие с высокой степенью достоверности выявлять межсемейный и внутрисемейный полиморфизм, устанавливать чистоту и гибридность пчелосемей. Моделирование в программе STRUCTURE v.2.3.4 позволило дифференцировать исследуемые пчелосемьи на три кластера. Точность принадлежности варьировала от 79,3 до 99,3%. Выявлены пчелосемьи с разной степенью метизации. Рассчитанное значение индекса фиксации  $F_{IS}$  (в среднем 0,107) свидетельствовало о преобладании гетерозигот в исследуемых пчелосемьях, а значение  $H_o < H_e$  — об интенсивном процессе межпородной гибридизации. Анализ мтДНК установил два варианта локуса COI-COII мтДНК — PQ и Q, что свидетельствует о принадлежности образцов к эволюционным линиям M и C.

**Ключевые слова:** медоносная пчела, *Apis mellifera* L., гибридизация, метизация, молекулярно-генетические методы идентификации, анализ митохондриальной ДНК, анализ ядерной ДНК.

### Введение

Медоносные пчелы (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae) — основные насекомые-опылители на нашей планете. Облетая около 80% дикорастущих и культурных растений, способствуют получению максимальных урожаев. Опыление пчелами положительно отражается на питательных и вкусовых качествах плодов и посевных кондициях семян [1]. С каждым годом растет актуальность исследований, связанных с изучением биологии медоносных пчел. Это обусловлено негативными процессами, такими как уменьшение биоразнообразия и снижение количества пчелиных семей, наблюдаемыми в большинстве стран. Так в Европе за последние 20 лет количество пчелосемей снизилось на 16% [2], в США ежегодные потери приближаются к 50% [3]. Среди генетических причин, вызывающих резкое сокращение численности пчелосемей, называют массовую гибридизацию вследствие бесконтрольного завоза и научно-необоснованного разведения пчел.

В результате гибридизации пчелы теряют

комплекс адаптивных признаков [4]. Показано, что гибридные пчелы менее устойчивы к абиотическим стресс-факторам [5, 6], воздействию пестицидов [7, 8], характеризуются пониженным иммунитетом [9, 10], что повышает их восприимчивость к паразитам [11, 12] и патогенам [13, 14]. Результатом межпородной метизации становится снижение адаптации гибридных пчелиных семей к меняющимся условиям окружающей среды, что также приводит к увеличению их гибели. При гибридизации и потери чистопородности происходит утрата генофондов аборигенных подвидов пчел [15]. В настоящее время темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L., один из уникальных подвидов медоносной пчелы, признан исчезающим на территории Европы [16]. Таким образом, вопросы сохранения чистопородности *A. mellifera* приобретают мировое значение.

Одно из основных условий сохранения генофонда любого биологического вида является его достоверная идентификация. Наиболее часто таксономическую принадлежность пчел оценивают по морфометрическим характери-

стикам. Однако последние исследования показали, что точность данного метода зависит от выбранных для анализа признаков [17]. В условиях массовой гибридизации пчел основными инструментами идентификации становятся методы молекулярно-генетического анализа.

Секвенирование митохондриальной ДНК (мтДНК) пчел выявило существование полиморфизма в спейсерном участке, локализованном между генами *COI* и *COII* (последовательность между генами цитохромоксидазы I и цитохромоксидазы II). Известно, что этот участок образован последовательностью гена тРНК-Leu и сложными повторами АТ-пар [18]. Повторы сгруппированы Р и Q элементами. Элемент Р длиной 54 п. н. состоит только из АТ-пар, содержание АТ-пар в элементе Q составляет 93% [19]. В сложных повторах Р-Q элементов Р может иметь варианты Р0, Р1, Р2, отличающиеся небольшими делециями и инсерциями. Пчелы разных пород характеризуются разными комбинациями элементов Р и Q. Наиболее короткий фрагмент локуса *COI-COII* мтДНК, содержащий единственный элемент Q, выявляется у подвидов южных пород пчел (серая горная кавказская, карпатская, итальянская и др.), у среднерусской породы регистрируются несколько вариантов локуса — РQQ, РQQQ, РQQQQ (от 500 п. н. до 1 500 п. н.). Вариабельность длины межгенного локуса *COI-COII* мтДНК обнаруживается ПЦР, дополнительный полиморфизм выявляется при ПДРФ-анализе (DraI-тест), который позволяет дифференцировать свыше 100 гаплотипов медоносной пчелы [20]. Однако, материнский тип наследования мтДНК создает некоторые ограничения для молекулярно-филогенетических исследований пчел и позволяет установить происхождение только по материнской линии.

Микросателлитные локусы являются удобным инструментом для анализа генетической структуры популяций, оценки гетерозиготности, степени инбридинга, определения коэффициентов генетического родства, вычисления генетических дистанций между популяциями и подвидами и оценки включения чужеродных генов одних видов в генные комплексы других. Это связано с тем, что микросателлитные локусы имеют ряд преимуществ: они многочисленны, гипервариабельны, чрезвычайно

информативны и широко представлены по всему геному.

Первые микросателлитные локусы у *Apis mellifera* были описаны в 1993 г. [19]. К настоящему времени у медоносных пчел известно около 552 полиморфных STR-маркеров [21], что позволило создать на их основе карту сцепления [22]. В геноме медоносной пчелы 60% всех микросателлитов приходится на кодирующую область, при этом 50% тринуклеотидных и 25% динуклеотидных повторов расположены в экзонах [23]. Все эти локусы полиморфные и многие из них успешно амплифицируются у других видов рода *Apis* — *A. cerana* (58%), *A. dorsata* (59%) и *A. florea* (38%). К настоящему времени на основании данных о степени полиморфизма STR-локусов охарактеризованы популяции медоносных пчел Европы [24, 25], Ближнего Востока [26] и Африки [27].

Пчеловодство — важная отрасль сельского хозяйства и древний промысел населения Беларуси с тысячелетним опытом и традициями. Характерными этапами его становления и развития выступали охота за медом, бортничество, колодное пасечное хозяйство, рамочная система содержания пчел. Разрушение местных, аборигенных, пчел в Беларуси началось в послевоенные годы, когда для восстановления пчеловодства в колхозы и совхозы тысячами завозились пчелопакеты с Северного Кавказа и Закавказья. Был внедрен план породного районирования, в результате которого повсеместно использовались пчеломатки южных подвидов [28]. К сожалению, и в настоящий момент на территории республики продолжает осуществляться активная и планомерная инвазия зарубежных пород пчел с целью максимального получения товарного меда. На фоне бесконтрольного завоза пчел и последующей их метизации, все более актуальным становится сохранение и разведение чистопородных пчел.

В Беларуси нами начаты системные молекулярно-генетические исследования пасечных и бортных медоносных пчел, обитающих на территории республики [29, 30]. Цель работы заключалась в определении комплекса ДНК-маркеров, позволяющих устанавливать чистопородность и выявлять метизацию медоносных пчел.

### Материалы и методы

Материалом для исследований служили рабочие пчелы *Apis mellifera*, собранные самостоятельно владельцами пасек. Нами случайным образом отбирались по 10 особей из 50 пчел каждой семьи, которые привозили с пасек в лабораторию, выделялась ДНК и проводился индивидуальный анализ. В таблице 1 указано название линии/породы пчел (со слов пчеловода) и расположение пасеки.

Отобранных для исследования пчел фиксировали в 96% этаноле и хранили до выделения ДНК при  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Выделение ДНК проводили из торакса (груди) и брюшка. Материал измельчали, ресуспендировали в 200 мкл ТЕ буфера (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA). Для выделения ДНК использовали Genomic DNA Purification Kit (#K0512) (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ полиморфизма локуса COI-COII в мтДНК проводили с использованием ПЦР со специфическими праймерами (GGCAGAATAAGTGCATTG; CAATATCATTTGATGACC). Реакционная смесь включала 20 нг геномной ДНК, по 5 пмоль прямого и обратного праймера, 2

мМ смеси дНТП (dNTPs), 50 mM MgCl<sub>2</sub> и 5 ед./мкл Taq-полимеразы. ПЦР проводили в термоциклере MyCycler™ (BioRad, США) в следующих условиях: 92 °C в течение 3 мин, 30 циклов с параметрами: денатурация при 92 °C — 30 сек, отжиг праймеров при 500 °C — 1 мин 30 сек, элонгация при 63 °C — 2 мин. Конечная элонгация при 72 °C — 10 мин. Качество прохождения реакции оценивалось по гель-электрофорезу. При наличии продукта реакции проводили рестрикционный анализ (DraI-тест) с использованием эндонуклеазы DraI (SibEnzyme®) в соответствии с инструкцией производителя. Продукты рестрикции оценивали в 1,5% агарозном геле.

Анализ полиморфизма микросателлитных повторов ДНК проводили с использованием ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами [31]. Реакционная смесь включала 20 нг геномной ДНК, по 5 пмоль прямого и обратного праймера, 2 mM смеси дНТП (dNTPs), 50 mM MgCl<sub>2</sub> и 5 ед./мкл Taq-полимеразы. ПЦР проводили в термоциклере Thermal Cycler C1000 (BioRad, США) в следующих условиях: 94 °C — 3 мин, 30 циклов с параметрами:

Таблица 1

Перечень образцов медоносных пчел, использованных в исследовании

№	Линия/порода, происхождение	Расположение пасеки
1	Маркен 1. Бакфаст. Голландия	Минский район
2	Маркен 2. Бакфаст. Голландия	
3	KB057 × KB294. Линия Келд. Бранштруб	
4	Альгердас Альшеюс. Каунас. Литва	
5	Бакфаст. Кричев. Беларусь	
6	Линия 81. Краинка. Австрия	
7	Nieska. Краинка. Польша	
8	Альпийка. Польша	
9	Среднерусская	Полесский радиоэкологический заповедник.
10	Среднерусская	
11	Среднерусская	
12	Гибрид Краинка × Карпатка	Молодечненский район

денатурация при 94 °С — 30 сек, отжиг праймеров — 30 сек (температура отжига подбиралась в зависимости от праймера), элонгация при 72 °С — 30 сек. Конечная элонгация при 72 °С — 10 мин. Качество прохождения реакции оценивалось по геле-электрофорезу. При наличии продукта реакции фрагменты разделялись на приборе с большей разрешающей способностью ABI3500 Genetic Analyzer, который, считывая флуорофор метки, определял размер фрагмента в сравнении со стандартом MCLAB's Orange DNA Size Standard. Уровни генетической структуры популяции вычисляли на основе R-статистики Райта.

Филогенетические отношения установлены путем расчета парных генетических расстояний Nei [32] с использованием GenAlEx 6.41

[33]. Кластерный анализ был проведен с помощью программы STRUCTURE 2.3.4 [34]. Количество кластеров (K) находилось в диапазоне от 1 до 10. Для визуализации результатов, их математического подтверждения методами Evanno [35] была использована веб-программа STRUCTURE Harvester [36].

### Результаты и обсуждения

#### Специфичность образцов по полиморфизму локуса COI-COII мтДНК

При индивидуальном ДНК-анализе пчел по локусу COI-COII, особи с разными гаплотипами внутри семьи не выявлены. При анализе межсемейного полиморфизма найдены два варианта фрагмента P-Q локуса COI-COII мтДНК — Q и PQ (табл. 2).

Таблица 2

Выявленные варианты локуса COI-COII мтДНК

№	Линия/порода пчел	Элемент	№	Линия/порода пчел	Элемент
1	Маркен 1. Бакфаст	PQ	7	Nieska. Краинка	Q
2	Маркен 2. Бакфаст	Q	8	Альпийка	Q
3	KB057 × KB294. Линия Келд	Q	9	Среднерусская	Q
4	Альгердас Альшеюс	Q	10	Среднерусская	Q
5	Бакфаст	Q	11	Среднерусская	Q
6	Линия 81. Краинка	Q	12	Гибрид Краинка × Карпатка	Q

У пчел семьи 1 в локусе COI-COII амплифицирован фрагмент размером 600–650 п. н., у пчел семей 2–12 — фрагмент размером 500–550 п. н. Наиболее коротким фрагментом локуса COI-COII мтДНК, содержащим только элемент Q в одной копии, характеризуются южные подвиды пчел эволюционной ветви С (*meda*, *caucasica*, *secropia*, *carnica*, *ligustica*), обитающие на территории от Ближнего Востока до Италии. Подвиды пчел, относящиеся к эволюционным ветвям А, М, О, У и Z, характеризуются более длинным фрагментом локуса COI-COII мтДНК и содержат одну копию элемента P в разных вариантах и от 1 до 5 копий элемента Q [37].

С целью подтверждения полученных данных

мы проводили DraI-тест. Известно, что межгенная область COI-COII мтДНК *A. mellifera* вариабельна по длине за счет различного количества копий последовательности Q (192–196 п. н.) и полной или частичной делеции последовательности P<sub>0</sub> (67 п. н.). Анализ вариации длины фрагмента P-Q и полиморфизма сайта рестрикции легли в основу теста для дополнительной характеристики гаплотипов мтДНК. Разработчики теста изучили 302 пчелосемьи, принадлежащих к 12 подвидам, и обнаружили 21 вариант гаплотипов, которые были однозначно отнесены к той или иной эволюционной линии подвида по мтДНК [20]. В результате ПЦР и последующей рестрикции выявляются 7 вариантов гаплотипов: P<sub>0</sub>Q,

$P_0QQ$ ,  $P_0QQQ$ ,  $PQ$ ,  $PQQ$ ,  $PQQQ$ ,  $Q$ , которые имеют различные сочетания трех последовательностей  $P_0$  (67 п. н.),  $P$  (54 п. н.) и  $Q$  (192–196 п. н.) [20].

Результаты проведенного нами *DraI*-теста показали, что у образцов семьи 1 самый «тяжелый» фрагмент рестрикции был приблизительно 500 п. н., у образцов семей 2–12 самый «тяжелый» фрагмент рестрикции — 400–430 п. н. Сравнивая полученные данные с картой рестрикции [20], мы установили, что образцы семьи 1 соответствуют гаплотипу M2, который характеризуется наличием фрагмента рестрикции 483/487 п. н. и соответствует пчелам западно-европейского происхождения, образцы семей 2–12 соответствуют гаплотипу C1, который характеризуется наличием фрагмента рестрикции 420–422 п. н. и соответствует пчелам, обитающим в регионе северного Средиземноморья.

Таким образом, по анализу мтДНК установлено, что пчелосемьи 1 и 2, заявленные

как аналогичные, принадлежат к разным подвидам: 1 пчелосемья — *A. m. mellifera* или *A. m. iberiensis*; 2 пчелосемья — *A. m. caucasica*, или *A. m. carnica*, или *A. m. ligustica*. Образцы семей 9, 10, 11 заявленные как среднерусская порода пчел (*A. m. mellifera*) по данным анализа мтДНК принадлежат к южным породам пчел (*A. m. caucasica*, или *A. m. carnica*, или *A. m. ligustica*).

*Генетическое разнообразие, чистота и гибридность пчелосемей*

По данным литературы, нами подобраны 8 STR-локусов, которые являются наиболее полиморфными у большинства подвидов пчел, обитающих на территории Европы и России. Оптимизация условий ПЦР позволила получить четкую картину амплификации и установить внутрисемейный (чистота) и межсемейный полиморфизм.

Всего было идентифицировано 172 аллеля размером от 65 до 316 п. н. (табл. 3).

Таблица 3

Характеристика проанализированных STR-локусов

STR-локус	Номер хромосомы	Количество выявленных аллелей	Количество редких аллелей	Размер аллеля, п. н.	
				минимальный	максимальный
A24	7	15	9 (60,0%)	95	214
A88	8	12	4 (33,3%)	136	156
A113	6	29	15 (51,7%)	124	246
AP043	3	27	14 (51,8%)	110	222
НВ-ТНЕ-03	13	19	4 (21,1%)	179	204
НВ-С16-01	16	34	14 (42,2%)	247	316
НВ-С16-05	1	18	12 (66,7%)	65	108
A28a	14	18	10 (55,6%)	112	144

Число выявленных аллелей варьировало в зависимости от пчелосемьи и от локуса: от 1 (A24) до 11 (AP043), среднее число аллелей на локус составляло от 3,7 (НВ-С16-05) до 7,3 (НВ-С16-01) (табл. 4). Среднее эффективное число аллелей составило 3,3. Обнаружено 82 редких аллеля, что составляет 47,7% от общего числа аллелей, частота встречаемости

редких аллелей варьировала от 0,050 до 0,25. Наиболее полиморфными оказались микросателлитные локусы НВ-С16-01, НВ-ТНЕ-03, А113, AP043, в которых выявлялось от 7 до 11 аллелей. Самым полиморфным из всех восьми SSR-локусов был локус НВ-С16-01, в нем зафиксировано 34 аллеля, из них 14 редких (с частотой встречаемости менее 0,3%).

Таблица 4

## Популяционно-генетические параметры исследуемых пчелосемей

Локус	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F <sub>IS</sub>
<i>семья №1. Маркен 1. Бакфаст. Голландия</i>							
HB-C16-05	3	2,571	1,011	0,500	0,611	0,667	0,182
HB-C16-01	6	5,143	1,705	1	0,806	0,879	-0,241
HB-THE-03	5	3,273	1,352	0,833	0,694	0,758	-0,200
A88	4	3,600	1,330	0,833	0,722	0,788	-0,154
A113	7	4,909	1,736	0,778	0,796	0,843	0,023
AP043	7	4,909	1,754	0,778	0,796	0,843	0,023
A24	5	2,382	1,165	0,444	0,580	0,614	0,234
A28a	6	2,783	1,363	0,375	0,641	0,683	0,415
среднее	5,375	3,696	1,427	0,693	0,706	0,759	0,035
σ	0,498	0,402	0,098	0,079	0,032	0,034	0,082
<i>семья №2. Маркен 2. Бакфаст. Голландия</i>							
HB-C16-05	3	2,740	1,049	0,700	0,635	0,668	-0,102
HB-C16-01	9	4,444	1,817	1	0,775	0,816	-0,290
HB-THE-03	9	6,667	2,030	1	0,850	0,895	-0,176
A88	4	2,597	1,094	0,700	0,615	0,647	-0,138
A113	8	4,878	1,803	0,700	0,795	0,837	0,119
AP043	11	7,692	2,221	0,900	0,870	0,916	-0,034
A24	5	3,509	1,392	0,900	0,715	0,753	-0,259
A28a	5	3,175	1,331	0,800	0,685	0,721	-0,168
среднее	6,750	4,463	1,592	0,838	0,743	0,782	-0,131
σ	1,013	0,661	0,154	0,046	0,034	0,035	0,046
<i>семья №3. KB057 × KB294. Линия Келд. Бранитруб</i>							
HB-C16-05	2	1,835	0,647	0,700	0,455	0,479	-0,538
HB-C16-01	5	2,909	1,249	1	0,656	0,700	-0,524
HB-THE-03	4	2,746	1,132	0,222	0,636	0,673	0,650
A88	2	1,105	0,199	0,100	0,095	0,100	-0,053
A113	5	4	1,474	0,750	0,750	0,800	0
AP043	7	4,444	1,653	0,800	0,775	0,816	-0,032
A24	1	1	0	0	0	0	-

## Продолжение таблицы 4

Локус	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F <sub>IS</sub>
A28a	7	4,444	1,678	0,700	0,775	0,816	0,097
среднее	4,125	2,810	1,004	0,534	0,518	0,548	-0,057
σ	0,811	0,498	0,230	0,131	0,109	0,116	0,143
<i>семья №4. Альгердас Альшиюс. Каунас. Литва</i>							
НВ-С16-05	3	2,667	1,040	0,700	0,625	0,658	-0,120
НВ-С16-01	7	5,128	1,749	1	0,805	0,847	-0,242
НВ-ТНЕ-03	5	4,348	1,511	1	0,770	0,811	-0,299
A88	2	1,969	0,685	0,875	0,492	0,525	-0,778
A113	6	4,082	1,569	0,800	0,755	0,795	-0,060
AP043	3	1,942	0,791	0,600	0,485	0,511	-0,237
A24	3	1,942	0,791	0,500	0,485	0,511	-0,031
A28a	3	1,653	0,687	0,400	0,395	0,416	-0,013
среднее	4	2,966	1,103	0,734	0,602	0,634	-0,222
σ	0,627	0,477	0,155	0,079	0,056	0,059	0,088
<i>семья №5. Бакфаст. Кричев. Беларусь</i>							
НВ-С16-05	2	1,600	0,562	0,500	0,375	0,395	-0,333
НВ-С16-01	4	2,353	1,063	0,700	0,575	0,605	-0,217
НВ-ТНЕ-03	5	3,175	1,331	0,900	0,685	0,721	-0,314
A88	3	2,778	1,055	0,800	0,640	0,674	-0,250
A113	4	1,800	0,855	0,556	0,444	0,471	-0,250
AP043	4	2,326	0,996	0,800	0,570	0,600	-0,404
A24	5	1,942	1,010	0,300	0,485	0,511	0,381
A28a	5	3,774	1,431	0,800	0,735	0,774	-0,088
среднее	4	2,468	1,038	0,669	0,564	0,594	-0,184
σ	0,378	0,261	0,095	0,071	0,044	0,046	0,087
<i>семья №6. Линия 81. Краинка. Австрия</i>							
НВ-С16-05	2	1,220	0,325	0,200	0,180	0,189	-0,111
НВ-С16-01	8	4,878	1,803	0,900	0,795	0,837	-0,132
НВ-ТНЕ-03	8	5,714	1,874	1	0,825	0,868	-0,212
A88	4	2,410	1,013	1	0,585	0,616	-0,709
A113	3	2,198	0,856	1	0,545	0,574	-0,835

## Продолжение таблицы 4

Локус	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F <sub>IS</sub>
AP043	5	3,922	1,449	0,900	0,745	0,784	-0,208
A24	8	4,082	1,692	0,900	0,755	0,795	-0,192
A28a	4	1,527	0,708	0,100	0,345	0,363	0,710
среднее	5,250	3,244	1,215	0,750	0,597	0,628	-0,211
σ	0,861	0,579	0,202	0,132	0,082	0,087	0,164
<i>семья №7. Nieska. Краинка. Польша</i>							
HB-C16-05	3	2,462	0,974	1	0,594	0,633	-0,684
HB-C16-01	5	3,057	1,330	1	0,673	0,712	-0,486
HB-THE-03	5	2,893	1,268	0,556	0,654	0,693	0,151
A88	2	1,117	0,215	0,111	0,105	0,111	-0,059
A113	3	1,906	0,787	0,667	0,475	0,503	-0,403
AP043	5	2,531	1,164	0,556	0,605	0,641	0,082
A24	4	2,492	1,087	0,667	0,599	0,634	-0,113
A28a	4	2,348	1,088	0,556	0,574	0,608	0,032
среднее	3,875	2,351	0,989	0,639	0,535	0,567	-0,185
σ	0,398	0,214	0,126	0,100	0,065	0,069	0,107
<i>семья №8. Альтейка. Польша</i>							
HB-C16-05	4	2,381	1,089	0,600	0,580	0,611	-0,034
HB-C16-01	8	5,882	1,900	1	0,830	0,874	-0,205
HB-THE-03	7	3,774	1,608	0,900	0,735	0,774	-0,224
A88	4	1,905	0,914	0,300	0,475	0,500	0,368
A113	4	2,656	1,168	0,778	0,623	0,660	-0,248
AP043	5	3,636	1,383	0,800	0,725	0,763	-0,103
A24	2	1,835	0,647	0,700	0,455	0,479	-0,538
A28a	3	1,515	0,639	0,200	0,340	0,358	0,412
среднее	4,625	2,948	1,169	0,660	0,595	0,627	-0,072
σ	0,706	0,510	0,158	0,099	0,059	0,062	0,113
<i>семья №9. Среднерусская. Полесский радиозоологический заповедник</i>							
HB-C16-05	6	3,846	1,500	0,800	0,740	0,779	-0,081
HB-C16-01	9	4,762	1,843	1	0,790	0,832	-0,266

## Продолжение таблицы 4

Лocus	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F <sub>IS</sub>
HB-THE-03	2	2	0,693	1	0,500	0,600	-1
A88	4	3,175	1,258	0,900	0,685	0,721	-0,314
A113	5	3,846	1,448	0,900	0,740	0,779	-0,216
AP043	6	2,857	1,373	0,600	0,650	0,684	0,077
A24	3	1,412	0,566	0,333	0,292	0,318	-0,143
A28a	2	1,117	0,215	0,111	0,105	0,111	-0,059
среднее	4,625	2,877	1,112	0,706	0,563	0,603	-0,250
σ	0,844	0,454	0,197	0,117	0,087	0,090	0,116
<i>семья № 10. Среднерусская. Полесский радиоэкологический заповедник</i>							
HB-C16-05	6	3,240	1,455	0,778	0,691	0,732	-0,125
HB-C16-01	11	5	2,025	0,900	0,800	0,842	-0,125
HB-THE-03	4	2,571	1,120	0,444	0,611	0,647	0,273
A88	5	2,469	1,201	0,700	0,595	0,626	-0,176
A113	9	6,061	1,970	0,800	0,835	0,879	0,042
AP043	7	5	1,739	0,700	0,800	0,842	0,125
A24	7	5,714	1,831	0,900	0,825	0,868	-0,091
A28a	3	2,800	1,061	0,286	0,643	0,692	0,556
среднее	6,500	4,107	1,550	0,688	0,725	0,766	0,060
σ	0,926	0,526	0,138	0,077	0,036	0,037	0,089
<i>семья № 11. Среднерусская. Полесский радиоэкологический заповедник</i>							
HB-C16-05	5	2,128	1,051	0,400	0,530	0,558	0,245
HB-C16-01	9	5,556	1,968	0,900	0,820	0,863	-0,098
HB-THE-03	9	6,452	2,013	0,800	0,845	0,889	0,053
A88	6	4,651	1,640	0,600	0,785	0,826	0,236
A113	9	5,714	1,947	0,900	0,825	0,868	-0,091
AP043	8	3,390	1,610	0,900	0,705	0,742	-0,277
A24	5	2,740	1,261	0,500	0,635	0,668	0,213
A28a	2	1,471	0,500	0,200	0,320	0,337	0,375
среднее	6,625	4,013	1,499	0,650	0,683	0,719	0,082
σ	0,905	0,650	0,188	0,094	0,065	0,068	0,078

## Окончание таблицы 4

Локус	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F <sub>IS</sub>
<i>семья № 12. Гибрид Краинка x Карпатка</i>							
НВ-С16-05	6	3,390	1,440	0,900	0,705	0,742	-0,277
НВ-С16-01	7	5,556	1,825	0,900	0,820	0,863	-0,098
НВ-ГНЕ-03	6	2,778	1,330	0,300	0,640	0,674	0,531
A88	6	3,226	1,446	1	0,690	0,726	-0,449
A113	5	2,941	1,277	1	0,660	0,695	-0,515
AP043	4	3,175	1,258	1	0,685	0,721	-0,460
A24	4	3,448	1,304	1	0,710	0,747	-0,408
A28a	2	2	0,693	0,400	0,500	0,526	0,200
среднее	5	3,314	1,322	0,813	0,676	0,712	-0,184
σ	0,567	0,359	0,111	0,103	0,031	0,033	0,132

**Примечание.** Na — количество выявленных аллелей, Ne — количество эффективных аллелей, I — информационный индекс Шеннона, Ho — наблюдаемая гетерозиготность, He — ожидаемая гетерозиготность, F<sub>IS</sub> — коэффициент инбридинга

В таблице 5 приведены результаты вычислений популяционно-генетических параметров исследуемых пчелосемей. Анализ высокополиморфных STR-локусов показал, что в трех из двенадцати исследованных пчелосемей отмечен незначительный дефицит гетерозигот (семьи 1, 10, 11) (табл. 4), остальные семьи не испытывали дефицита гетерозигот ( $H_o < H_e$ ), что свидетельствует об интенсивном процессе межпородной гибридизации в данных пчелосемьях. Наибольшее генетическое разнообразие по величине индекса Шеннона установлено у пчелосемей 2 ( $I = 1,592$ ), 10 ( $I = 1,550$ ), 11 ( $I = 1,499$ ), наименьшее — у пчелосемьи 7 ( $I = 0,989$ ).

Индекс фиксации F<sub>IS</sub> варьировал от 0,187 до -0,236 в зависимости от локуса, и в среднем составил -0,107, что подтверждает преобладание гетерозигот (табл. 5). Значения индекса F<sub>ST</sub> также показали, что 78,7% всего разнообразия обусловлено внутрисемейными различиями и только 21,3% приходится на межсемей-

ные различия. Минимальные межсемейные различия отмечены по локусу AP043 (11%), максимальные — по локусу A88 (30%).

Микросателлитные маркеры достаточно информативны и активно используются при изучении генетического разнообразия медоносных пчел. Cornuet J. M. показал, что для получения статистически значимой оценки структуры популяции медоносной пчелы, а также для отнесения особей неизвестного происхождения к популяциям на основании генетического расстояния между особями и популяциями достаточно изучить полиморфизм 10 микросателлитных маркеров [38]. Современные исследования специалистов доказали, что достоверные результаты могут быть получены и при меньшем количестве SSR-маркеров.

На основе изучения вариабельности 7 микросателлитных локусов определена зона интрогрессии между пчелами подвидов *A. m. mellifera* и *A. m. ligustica* в Альпах на гра-

Таблица 5

Коэффициенты F-статистики Райта, рассчитанные для исследуемых пчелосемей

SSR-локус	$F_{is}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
HB-C16-05	-0,157	0,117	0,237
HB-C16-01	-0,236	-0,005	0,186
HB-THE-03	-0,060	0,158	0,206
A88	-0,221	0,151	0,305
A113	-0,168	0,086	0,217
AP043	-0,110	0,013	0,110
A24	-0,093	0,202	0,270
A28a	0,187	0,329	0,175
среднее	-0,107	0,131	0,213
$\Sigma$	0,047	0,038	0,021

нице между Францией и Италией [16], в Швейцарии, Норвегии, Франции [39], Польше [40]. Анализ варибельности 6 микросателлитных локусов позволил выяснить относительную чистоту линий иберийской популяции пчел подвида *A. m. iberiensis* в Испании и доказать генетическую изоляцию от популяции пчел подвида *A. m. intermissa* из Северной Африки и Португалии [41].

Мы изучили полиморфизм восьми высокополиморфных SSR-локусов в пчелосемьях и выполнили анализ структуры с использованием моделирования в STRUCTURE v.2.3.4. Обнаружена достоверная разница между образцами и показана дифференциация на три четко выраженных кластера ( $K = 3$ ). Точность консолидированности большинства особей в пределах кластера 1 (34 особей из 120 включенных в анализ) варьировала в пределах от 79,3 до 99,2%. Аналогичный показатель для особей в пределах кластера 2 (56/120) — от 75,9 до 99,2% и для особей в пределах кластера 3 (25/120) — от 88,0 до 99,3%. Зафиксировано пять пчел, вероятность отнесения которых к тому или иному кластеру колебалась от 30,8 до 68,3%. Индивидуальный молекулярно-генетический анализ пчел позволил оценить степень метизации в семьях. Установлено, что пчелосемья 1 состоит из особей, которые относятся к разным кластерам (4 : 5 : 1). Ана-

логичная, но в меньшей степени, ситуация наблюдается в пчелосемьях 4 (8 : 2), 5 (8 : 2), 9 (7 : 3), 10 (6 : 4). Выявление в одной семье рабочих пчел с разными генотипами связано с особенностями биологии размножения пчел — полиандрией. Это означает, что пчеломатка одновременно спаривалась с трутнями, отличающимися по своему генетическому происхождению (разные породы, экотипы и т. д.).

Пчелосемьи 2, 3, 6, 7, 8, 11, 12 являются генетически выровненными (чистыми) и однозначно кластеризуются.

Анализ генетических дистанций показал, что все пчелосемьи делятся на две ветки: к одной принадлежат пчелосемьи 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12; к другой — только одна пчелосемья 6 (рис. 1). Это означает, что шестая семья имеет отличное от других генетическое происхождение, что совпадает с информацией о стране происхождения данного образца — линия крайинской породы пчел австрийской селекции, которая, по данным молекулярно-генетического анализа, является «чистой», т. е. генетически однородной.

Остальные образцы — это разнообразные гибриды южных подвидов пчел. Анализ дендрограммы подтверждает данное заключение.

Семьи 1, 2, 3, 4, 5, 8 — принадлежат одной ветви дендрограммы с небольшими генетическими дистанциями между собой. Анализируя

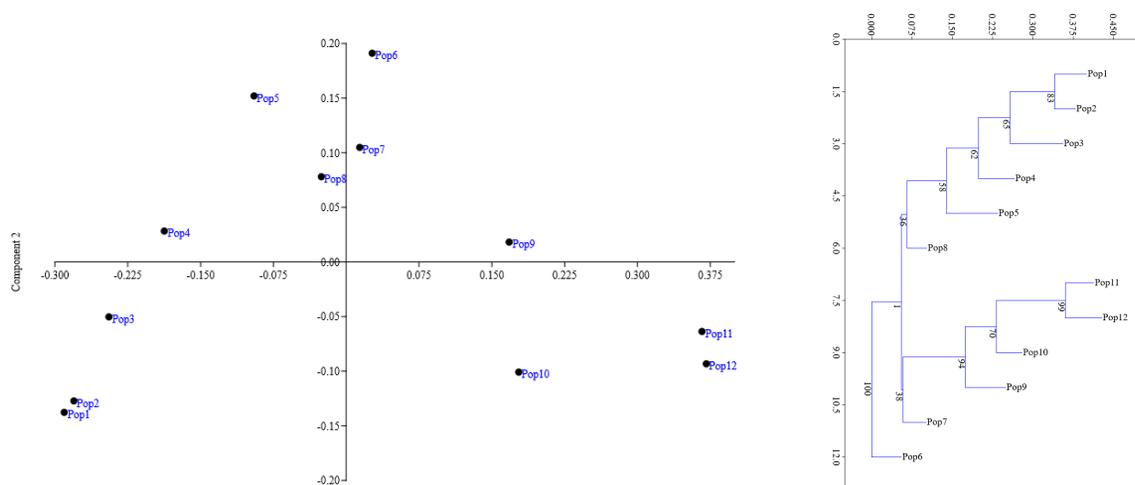


Рис. 1. Генетические расстояния между исследуемыми пчелосемьями

происхождение данных пчелосемей, можно однозначно заключить, что это гибриды породы Бакфаст. Данный вывод подтверждается максимальной генетической близостью 1 и 2 семьи, что совпадает с их заявленным общим происхождением (линии Бакфаст) (табл. 1, рис. 1). Известно, что порода Бакфаст получена путем скрещивания медоносных пчел подвида *A. m. ligustica* и местных популяций медоносных пчел Великобритании. Следовательно, образцы 3, 4, 5, 8 генетически близки к южному подвиду *A. m. ligustica*.

Семьи 7, 9, 10, 11, 12 также группируются на одной ветке дендрограммы, следовательно, являются генетически близкими. Образцы 7 и 12 заявлены как «Nieska. Краинка. Польша» и «гибрид Краинка × Карпатка». Вероятнее всего, это гибриды южных подвидов *A. m. carnica*, *A. m. carpatica*, которые широко используются в разведении на территории Восточной Европы, в том числе Беларуси (бытовое название Краинка и Карпатка). Семьи 9, 10, 11 были заявлены как среднерусские пчелы (табл. 1), однако анализ мтДНК и SSR-анализ опровергли эту информацию. Данные образцы однозначно являются южными подвидами пчел, а так как на дендрограмме они группируются вместе с образцами 7, 12, то являются гибридами подвидов *A. m. carnica*, *A. m. carpatica* (табл. 1, рис. 1).

Таким образом, комплексный молекулярно-генетический анализ пчелосемей с использованием восьми высокоэффективных

SSR-маркеров (НВ-С16-05, НВ-С16-01, НВ-ТНЕ-03, А88, А113, АР043, А24, А28а) и маркеров митохондриального генома позволил с высокой степенью достоверности выявить межсемейный и внутрисемейный полиморфизм, установить происхождение, чистоту и гибридность пчелосемей.

### Заключение

Для сохранения генофонда аборигенных пчел и чистопородного разведения необходима точная идентификация подвидовой принадлежности и происхождения семей. Только использование молекулярно-генетических методов оказывается эффективным для различения подвидов медоносной пчелы с большим уровнем достоверности в условиях их массовой гибридизации. Нами определены категории информативных SSR-маркеров с высоким дифференцирующим потенциалом. Обнаружена достоверная разница в генетической структуре исследуемых пчелосемей и показано разделение на три кластера. Выявлен внутрисемейный и межсемейный генетический полиморфизм, установлены чистопородные и помесные пчелосемьи. Представленные в статье результаты исследований являются новыми данными о генетическом полиморфизме медоносных пчел, разводимых в Республике Беларусь.

### Список использованных источников

1. Харченко Н. А., Рындин В. Е. Пчеловод-

ство: учеб. для студ. вузов. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 368 с.

2. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe / S. G. Potts, S. P. Roberts, R. Dean, G. Marris, M. A. Brown, R. Jones, P. Neumann, J. Settele. – *Journal of Apicultural Research*. – 2010. – 49(1): 15–22 (doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.02).

3. Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology / van D. Engelsdorp, K. S. Traynor, M. Andree, E. M. Lichtenberg, Y. Chen, C. Saegerman, D. L. Cox-Foster. – *PLoS ONE*. – 2017. – 12(7): e0179535 (doi: 10.1371/journal.pone.0179535).

4. Анализ генетической структуры популяций медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) / М. Д. Каскинова, Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко. – *Генетика*, 2015. – 51, 1199–1202 (doi: 10.7868/S0016675815100070).

5. A case control study and a survey on mortalities of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in France during the winter of 2005–2006. / M. P. Chauzat, A.-C. Martel, Zeggane, S. Drajunudel, F. Schurr, M.-C. Clément, M. Ribière-Chabert, M. Aubet, J.-P. Faucon. – *Journal of Apicultural Research*. – 2010. – 49(1): 40–51 (doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.06).

6. EPILOBEE Consortium, Chauzat M. P., Jacques A., Laurent M., Bougeard S., Hendrikx P., Ribière-Chabert M. Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance. *Apidologie*, 2016, 47(3): 348–378 (doi: 10.1007/s13592-016-0440-z).

7. Pesticides and honey bee toxicity — USA / R. M. Johnson, M. D. Ellis, C. A. Mullin, M. Frazier. – *Apidologie*. – 2010. – 41(3): 312–331 (doi: 10.1051/apido/2010018).

8. van Engelsdorp D., Meixner M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2010. – 103(Suppl.): S80–S95 (doi: 10.1016/j.jip.2009.06.011).

9. Fundamentals of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system / A. Larsen, F. J. Reynaldi, E. Guzmán-Novoa. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. – 2019. – 10(3): 705–728 (doi: 10.22319/rmcp.v10i3.4785).

10. DeGrandi-Hoffman G., Chen Y. Nutrition, immunity and viral infections on honey bees.

*Current Opinion in Insect Science*, 2015, 10: 170–176 (doi: 10.1016/j.cois.2015.05.007).

11. High-resolution linkage analyses to identify genes that influence Varroa sensitive hygiene behavior in honey bees / J. M. Tsuruda, J. W. Harris, L. Bourgeois, R. G. Danko, G. J. Hunt. *PLoS ONE*. – 2012. – 7(11): e48276 (doi: 10.1371/journal.pone.0048276).

12. Long-term temporal trends of Nosema spp. infection prevalence in northeast Germany: continuous spread of *Nosema ceranae*, an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*), but no general replacement of *Nosema apis* / S. Gisder, V. Schüler, L. L. Horchler, D. Groth, E. Genersch. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017. – 7: 301 (doi: 10.3389/fcimb.2017.00301).

13. Honeybee immunity and colony losses / F. Nazzi, D. Annoscia, E. Caprio, Di Prisco G., F. Pennacchio. – *Entomologia*. – 2014. – 2(2) (doi: 10.4081/entomologia.2014.203).

14. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses / K. M. Smith, E. H. Loh, M. K. Rostal, C. M. Zambrana-Torrel, L. Mendiola, P. Daszak. *EcoHealth*. – 2014. – 10(4): 434–445 (doi: 10.1007/s10393-013-0870-2).

15. Ilyasov R. A., Poskryakov A. V., Nikolenko A. G. *Biomika*, 2017, 9(2): 71–90.

16. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honey bee, *Apis mellifera mellifera*, in north west Europe / A. B. Jensen, K. A. Palmer, J. J. Boomsa, B. V. Pedersen. – *Molecular Ecology*. – 2005. – 14: 93–106 (doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02399.x).

17. The accuracy of morphometric characteristic analysis depends on the type of the assessed traits of honey bees (*Apis cerana* F. and *Apis mellifera* L.) / Olga Frunze, Dong-Won Kim, Eun-Jin Kang, Kyungmun Kim, Bo-Sun Park, Yong-Soo Choi. – *Journal of Asia-Pacific Entomology*. – September, 2022 (doi: 10.1016/j.aspen.2022.101991).

18. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* / A. Wallberg, F. Han, G. Wellhagen, et al. – *Nature Genetics*. – 2014. – Vol. 46. – P. 1 081–1 088.

19. Estoup A. Characterization of (GT)<sub>n</sub> and (CT)<sub>n</sub> microsatellites in two insect species *Apis*

- mellifera and *Bombus terrestris* / A. Estoup, M. Solignac, M. Harry, J. M. Cornuet. – *Nucleic Acids Research*. – 1993. – Vol. 21, Is. 6. – P. 1 427–1 431.
20. Garnery L. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial-DNA to study the genetic-structure of *Apis mellifera* L. / L. Garnery, M. Solignac, G. Celebrano, J. M. Cornuet. – *Experientia*. – 1993. – Vol. 49, is. 11. – P. 1 016–1 021.
21. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera*) genome / M. Solignac, D. Vautrin, A. Loiseau, F. Mougel, E. Baudry, A. Estoup, L. Garnery, M. Haberl, J.-M. Cornuet. – *Molecular Ecology Notes*. – 2003. – 3(2): 307–311 (doi: 10.1046/j.1471- 8286.2003.00436.x).
22. A microsatellitebased linkage map of the honeybee, *Apis mellifera* L. / M. Solignac, D. Vautrin, E. Baudry, F. Mougel, A. Loiseau, J.-M. Cornuet. – *Genetics*. – 2004. – 167(1): 253–262 (doi: 10.1534/genetics.167.1.253).
23. InSatDb: a microsatellite database of fully sequenced insect genomes / S. Archak, E. Meduri, P. S. Kumar, J. Nagaraju. – *Nucleic Acids Research*. – 2007. – 35(Suppl\_1): D36-D39 (doi: 10.1093/nar/gkl778).
24. Hybrid origins of honey bees from Italy (*Apis mellifera mellifera*) and Sicily (*A. m. sicula*) / P. Franck, L. Garnery, G. Celebrano, M. Solignac, J.-M. Cornuet. – *Molecular Ecology*. – 2000. – 9(7): 907–921 (doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.00945.x).
25. Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia / S. Sušnik, P. Kozmus, J. Poklukar, V. Meglič. – *Apidologie*. – 2004. – 35(6): 623–636 (doi: 10.1051/apido:2004061).
26. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East / P. Franck, L. Garnery, M. Solignac, J.-M. Cornuet. *Apidologie*. – 2000. – 31(2): 167–180 (doi: 10.1051/apido:2000114).
27. Genetic diversity of the honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data / P. Franck, L. Garnery, A. Loiseau, B. P. Oldroyd, H. R. Hepburn, M. Solignac, J.-M. Cornuet. – *Heredity*. – 2001. – 86: 420–430 (doi: 10.1046/j.1365-2540.2001.00842.x).
28. Гузенко, Е. В. Генетическая характеристика медоносных пчел *Apis mellifera* L., разводимых на пасеках Беларуси / Е. В. Гузенко, А. И. Царь, В. Н. Кипень, В. А. Лемеш // Пчеловодство холодного и умеренного климата: Материалы 5-й Международной научно-практической конференции. – Москва-Псков, 2021. – С. 48–52.
29. Elena Guzenko, Nastassia Tsar, Viachaslav Kipen, Valentina Lemesh. Establishing of Taxonomic Affiliation and Hybridization of Honeybees (*Apis mellifera* L.) in Belarus Using Molecular Genetic Methods. – International Congress on Bee Sciences, 16–18 June 2022, P. 95.
30. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models / A. Estoup, L. Garnery, M. Solignac, J. M. Cornuet. – *Genetics*. – 1995 Jun;140(2):679-95. doi: 10.1093/genetics/140.2.679.
31. Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations / M. Nei. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1973. – Vol. 70, № 12. – P. 3 321–3 323.
32. Peakall, R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update / R. Peakall, P. E. Smouse. – *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28, № 19. – P. 2 537–2 539.
33. Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly. – *Genetics*. – 2000. – Vol. 155, № 2. – P. 945–959.
34. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet. – *Mol. Ecol.* – 2005. – Vol. 14, № 8. – P. 2 611–2 620.
35. Earl, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D. A. Earl, B. M. vonHoldt. – *Conservation Genetics Resources*. – 2012. – Vol. 4, № 2. – P. 359–361.
36. Garnery L., Franck P., Baudry E., et al. Genetic biodiversity of the West European honeybee (*Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera iberica*). II. Mitochondrial DNA. *Genetics, Selection and Evolution*. 1998; 30:31–47.
37. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals / J. M. Cornuet, S. Piry,

G. Luikart, A. Estoup, M. Solignac – *Genetics*, 1999. – 153(4): 1989–2000.

38. Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera* / G. Soland-Reckeweg, G. Heckel, P. Neumann, et al. – *Journal of Insect Conservation*. – 2009 – Vol. 13 – P. 317–28 (doi: 10.1007/s10841-008-9175-0).

39. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland / A. Oleksa, I. Chybicki, A. Tofilski, J. Burczyk. – *Journal of Apicultural*

*Research*. – 2011 – Vol. 50(2). – P. 116–129 (doi: 10.3896/IBRA.1.50.2.03).

40. Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores / De la Rúa P., J. Galián, B. V. Pedersen, J. Serrano. – *Apidologie*. – 2006 – Vol. 37 – P. 699–708.

41. Шеметков, М. Ф. Советы пчеловоду / М. Ф. Шеметков, В. И. Головнев, М. М. Кочевой. 3-е изд., перераб. и доп. – Мн.: «Ураждай», 1991. – 399 с.

**E. V. Guzenko**

**POPULATION AND GENETIC CHARACTERISTICS OF BEE COLONIES *APIS MELLIFERA* L. BRED IN THE APIARIES OF MINSK REGION OF THE REPUBLIC OF BELARUS**

State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: e.guzenko@igc.by

The Article presents data on the molecular genetic analysis of the bee colonies bred in the apiaries of Minsk Region (Belarus). Informative SSR markers, allowing the identification of intercolony and intracolony polymorphism with a high degree of reliability and establishing the purity and hybridity of bee colonies, were determined. Modeling, using STRUCTURE v.2.3.4, made it possible to differentiate the bee colonies under study into three clusters. The membership accuracy varied from 79.3 to 99.3%. Bee colonies with varying crossbreeding degrees were identified. The calculated value of the  $F_{IS}$  fixation index (average 0.107) indicated the predominance of heterozygotes in the bee colonies studied, and the  $H_o < H_e$  value indicated an intensive process of interbreeding hybridization. Analysis of mtDNA revealed two variants of the mtDNA COI-COII locus — PQ and Q, which indicates the belonging of samples to M and C evolutionary lines.

**Keywords:** honey bee, *Apis mellifera* L., hybridization, crossbreeding, molecular-genetic identification methods, mitochondrial DNA analysis, nuclear DNA analysis.

*Дата поступления в редакцию: 06 февраля 2023 г.*

И. Н. Андреева<sup>1</sup>, Е. П. Михаленко<sup>1</sup>, Е. И. Кузьмина<sup>1</sup>, О. М. Малышева<sup>1</sup>, А. В. Байда<sup>2</sup>,  
Н. Б. Кузнецова<sup>2</sup>, А. В. Кильчевский<sup>1</sup>

## ИНТЕГРАТИВНАЯ ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА И ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *CYP19A1* У ЖИТЕЛЕЙ БЕЛАРУСИ СТАРШЕЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: irishka14790@mail.ru

<sup>2</sup>Государственное учреждение образования  
«Белорусская академия последиplomного образования»  
Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3

Методом прямого секвенирования определены частоты встречаемости полиморфных вариантов rs10046 и rs4646 гена *CYP19A1* у жителей Беларуси старше 60 лет. Выявлены гендерные различия в распределении полиморфных вариантов rs10046 и rs4646: у мужчин младше 90 лет достоверно чаще, чем у женщин, встречались гомозиготные варианты TT (rs10046) и GG (rs4646), ассоциированные с повышенной активностью ароматазы ( $p = 0,028$  и  $p = 0,019$  соответственно). Установлено, что носительство полиморфного локуса TT rs10046 гена *CYP19A1* достоверно чаще встречается у женщин с избыточной массой тела (ИМТ  $\geq 25$ ) по сравнению с женщинами с нормальной массой тела (ИМТ  $< 25$ ) ( $p = 0,046$ ). Выявлена ассоциация полиморфных вариантов гена *CYP19A1* с показателями липидного обмена (общий холестерин, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП) у людей старше 60 лет с повышенной массой тела.

**Ключевые слова:** долголетие, старение, ароматаза, прямое секвенирование, генетический полиморфизм, ген *CYP19A1*.

### Введение

Одним из важных факторов социально-экономического развития общества является увеличение продолжительности жизни. Согласно статистическим данным за 2021 г., из 9 349 645 человек населения Беларуси около 1,54% (143 692 чел.) — люди старше 85 лет и около 21,6% (2 021 505 чел.) — люди в возрасте 60–85 лет [1]. Такое процентное соотношение свидетельствует о том, что в Республике Беларусь, как и во всем мире, наблюдается тенденция к увеличению доли людей пожилого и старческого возраста. Старение населения ставит задачи укрепления здоровья и расширения функциональных возможностей пожилых людей для увеличения их активной, полноценной жизни [2].

Особое значение проблема «здорового старения» приобретает в пожилом возрасте, когда человек становится наиболее уязвимым в экономическом, социальном и психологи-

ческом отношении, а также существенно ослабевают внутренние и внешние механизмы защиты от воздействия различных факторов риска, число которых в настоящее время резко возросло [3, 4]. В результате снижения уровня метаболической активности в организме лиц пожилого и старческого возраста наблюдается снижение содержания мышечной массы и увеличение доли жировой ткани. С усугубляющимися при этом нарушениями липидного гомеостаза сопряжены ускорение процессов атерогенеза и высокий риск развития ряда мультифакторных возраст-ассоциированных заболеваний. Избыточная масса тела (индекс массы тела (ИМТ)  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup>) и ожирение (ИМТ  $\geq 30$  кг/м<sup>2</sup>) часто наблюдаются у пациентов пожилого возраста с выраженной гипертриглицеридемией.

Известно, что жировая ткань функционирует как эндокринный орган и секретирует различные биологически активные вещества, которые

принимают участие в регуляции углеводного обмена (адипонектин, резистин), липидного обмена (лептин, ингибитор транспортного белка холестерина эфиров), асептического воспаления [5, 6]. Кроме того, жировая ткань является источником синтеза стероидных гормонов. В ней под действием ферментов происходит конверсия андрогенов в эстрогены.

Ароматаза — ферментный комплекс микросом, реализующий биосинтез эстрогена из андростендиона и эстрадиола из тестостерона. Повышенный уровень ароматазы у женщин старшей возрастной группы регистрируется в жировой ткани, так как именно в жировой ткани происходит синтез эстрогенов у женщин в период постменопаузы [7, 8]. Ген ароматазы *CYP19A1* человека локализован на 15-й хромосоме в локусе 15q21.2 (51,500,254-51,630,807), кодирующий регион размером около 30 т. п. н. включает девять (II–X) кодирующих экзонов [9, 10]. Ген ароматазы *CYP19A1* — высокополиморфный. При этом существуют выраженные межпопуляционные различия в частоте встречаемости полиморфных вариантов гена [11]. Полиморфизмы rs10046, rs4646 оказывают влияние на изменение экспрессии ароматазы.

Цель данного исследования — изучить аллельный полиморфизм гена *CYP19A1*, кодирующего ароматазу, у добровольцев старшей возрастной группы (старше 60 лет).

### Материалы и методы

Было получено 427 образцов биологического материала добровольцев старшей возрастной группы, из которых 158 человек долгожи-

тели (старше 90 лет) и 269 человек в возрасте 60–89 лет, проходивших лечение в отделениях Республиканского клинического госпиталя инвалидов Великой Отечественной Войны имени П. М. Машерова. Сбор биологического материала проводился с соблюдением этических норм (добровольность, конфиденциальность) с письменного информационного согласия пациентов.

На первом этапе из данного исследования были исключены пациенты, имеющие эндокринные заболевания и сахарный диабет 2-го типа, т. к. эти нозологии связаны с нарушением липидного обмена и гормонального состояния человека.

Молекулярно-генетические и клинические исследования были проведены у 327 добровольцев старше 60 лет. Антропометрические исследования проведены у 305 человек, у 22 человек отсутствуют данные об ИМТ. В зависимости от индекса массы тела сформированы две группы: группа 1 — основная группа — пациенты старше 60 лет с избыточной массой тела (ИМТ  $\geq 25$ ) — 113 человек; группа 2 — группа сравнения — пациенты старше 60 лет с нормальной массой тела (ИМТ  $< 25$ ) — 192 человека (табл. 1.).

Геномную ДНК выделяли из периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К с последующей очисткой этанолом. Для генотипирования локусов rs10046 и rs4646 гена *CYP19A1*, кодирующего фермент метаболизма эстрогенов ароматазу, использовали метод прямого секвенирования. В таблице 2 представлены праймеры и программа проведения ПЦР.

Таблица 1

Характеристика пациентов в исследуемых группах

Показатели	Группа 1 (основная группа)	Группа 2 (группа сравнения)
Всего	113	192
Старше 90 лет	24	82
60–89 лет	89	110
Мужчины	50	88
Женщины	63	104

**Таблица 2**

Последовательности праймеров и программа проведения ПЦР гена *CYP19A1*

Ген	Полиморфизмы	Последовательность праймера	Программа проведения ПЦР	Размер продукта, п. н.
<i>CYP19A1</i>	rs10046	F 5'-ccttgacccagatgagac-3'	94 °C — 3 мин, [94 °C — 40 сек, 56 °C — 40 сек, 72 °C — 40 сек] × 35 циклов, 72 °C — 10 мин	310
	rs4646	R 5'-cctcaaacctctggcctctg-3'		

Условия ПЦР подбирали экспериментально. Детекцию амплифицированного фрагмента проводили в горизонтальном агарозном геле с концентрацией 2,2%, обработку данных — с помощью компьютерной программы ImageLab. Терминирующую реакцию проводили с помощью коммерческого набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Определение нуклеотидной последовательности осуществляли на автоматическом генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 DNA Analyzer. Для анализа полученных сиквенсграмм использовали программу SequenceScanner v1.0.

Определены биохимические показатели крови: триглицериды (ТГ), общий холестерин (ОХ) и его фракции — холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) у 145 пациентов старшей возрастной группы. Использовались коммерческие диагностические наборы CORMAY (Польша), DIALAB (Австрия), Витал Диагностикс СПб (Россия), Erba Mannheim (Франция), Biomaxima (Польша). Измерения проводились на биохимических анализаторах Dialab Autolyzer (Австрия), Clima MC-15 (Испания). Биохимические исследования осуществлялись в лаборатории Института физиологии Национальной академии наук Беларуси.

Статистическую обработку данных проводили с использованием онлайн-программы SNPStats ([http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats\\_web](http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web)) и программы GraphPad InStat Version 3.05. При сравнении частот генотипов использовался стандартный критерий  $\chi^2$  Пир-

сона и отношение шансов (OR) с расчетом 95% доверительного интервала (95% CI). Проверку числовых значений на нормальность распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. Все количественные параметры соответствовали закону нормального распределения, поэтому проводили анализ с помощью t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа при межгрупповом сравнении. Количественные данные представляли в виде среднего арифметического и стандартной ошибки (Mean  $\pm$  SE). Статистически значимыми являлись различия при  $p < 0,05$  независимо от метода применяемого анализа.

### Результаты и обсуждения

В таблице 3 представлены частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *CYP19A1* с учетом пола и возраста обследуемых.

Среди обследуемых добровольцев младше 90 лет выявлены статистически значимые различия в распределении полиморфных вариантов rs10046 и rs4646 между мужчинами и женщинами. Носители генотипа GT rs4646 гена *CYP19A1* достоверно чаще встречаются среди женщин (40,3%) по сравнению с мужчинами (21,1%), уровень значимости  $p = 0,01$  (рис. 1). В то же время у мужчин младше 90 лет достоверно чаще, чем у женщин, встречались гомозиготные варианты TT (rs10046) и GG (rs4646), ассоциированные с повышенной активностью ароматазы и развитием некоторых заболеваний сердечно-сосудистой системы (уровень значимости  $p = 0,028$  и  $p = 0,019$  соответственно).

Результаты анализа полиморфных вариантов

Таблица 3

Частота встречаемости полиморфных вариантов гена *CYP19A1* с учетом пола и возраста добровольцев

Генотип	Мужчины (старше 90 лет)		Женщины (старше 90 лет)		Мужчины (60–89 лет)		Женщины (60–89 лет)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>CYP19A1</i> rs10046								
T/T	27	35,5	13	25,5	30	42,2	35	27,1*
C/T	39	51,3	27	52,9	30	42,2	71	55,5
C/C	10	13,2	11	21,6	11	15,6	23	17,8
<i>CYP19A1</i> rs4646								
G/G	49	64,5	30	58,8	52	73,2	71	55,5*
G/T	25	32,9	18	35,3	15	21,1	52	40,3*
T/T	2	2,6	3	5,9	4	5,6	6	4,7

Примечание. \* достоверные различия между мужчинами и женщинами

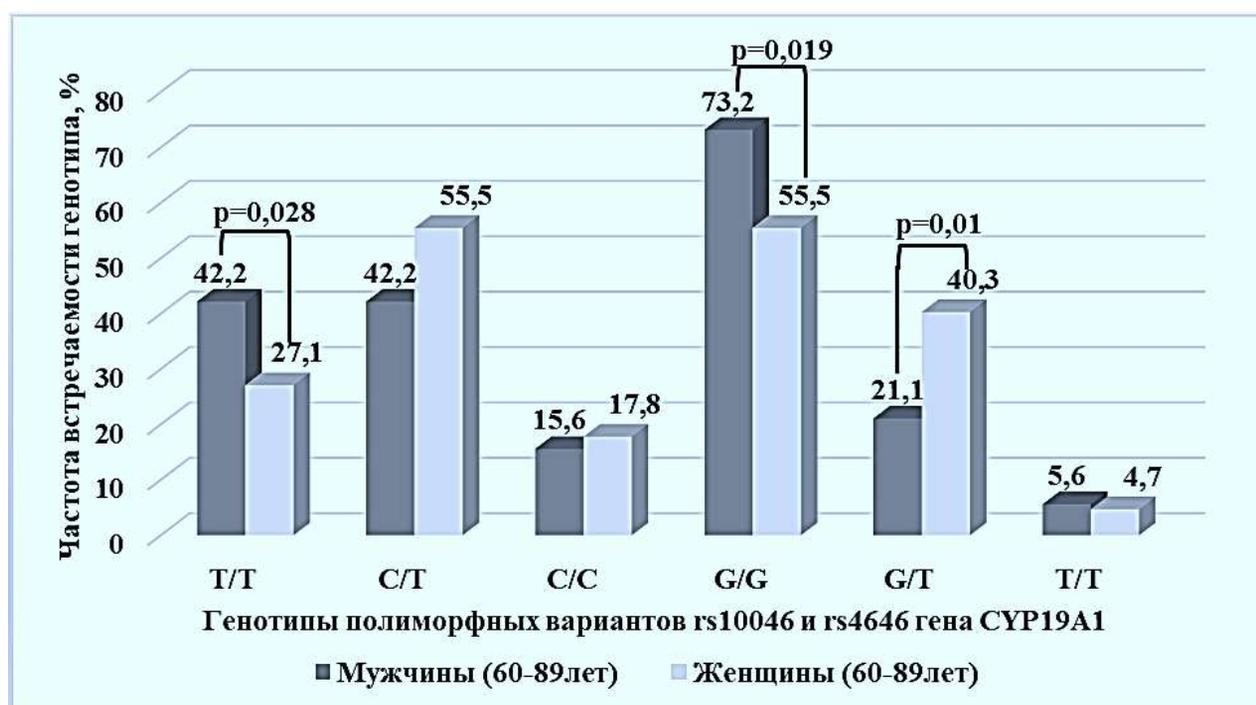


Рис. 1. Анализ полиморфных вариантов гена *CYP19A1* у добровольцев 60–89 лет в зависимости от пола

rs10046 и rs4646 у обследуемых в зависимости от ИМТ показали отсутствие статистически значимых различий изучаемых локусов гена *CYP19A1* при сравнении групп с разным

ИМТ (табл. 4).

Однако статистический анализ с учетом пола и ИМТ обследуемых выявил связь полиморфного варианта rs10046 гена *CYP19A1*

Таблица 4

Частоты встречаемости полиморфных вариантов rs10046 и rs4646 в группе 1 и группе 2

Модель	Генотип	Группа 2 (ИМТ <25)	Группа 1 (ИМТ ≥25)	OR (95% CI)	P-value
rs10046					
Кодоминантная	T/T	60 (31,2%)	42 (37,2%)	1,00	0,57
	C/T	99 (51,6%)	54 (47,8%)	1,28 (0,77–2,15)	
	C/C	33 (17,2%)	17 (15%)	1,36 (0,67–2,75)	
Доминантная	T/T	60 (31,2%)	42 (37,2%)	1,00	0,29
	C/T-C/C	132 (68,8%)	71 (62,8%)	1,30 (0,80–2,12)	
rs4646					
Кодоминантная	G/G	124 (64,6%)	65 (57,5%)	1,00	0,27
	G/T	58 (30,2%)	44 (38,9%)	0,69 (0,42–1,13)	
	T/T	10 (5,2%)	4 (3,5%)	1,31 (0,40–4,34)	
Доминантная	G/G	124 (64,6%)	65 (57,5%)	1,00	0,22
	G/T-T/T	68 (35,4%)	48 (42,5%)	0,74 (0,46–1,20)	

с избыточной массой тела в зависимости от пола пациентов (рис. 2). Среди обследованных добровольцев носители генотипа ТТ rs10046 гена *CYP19A1* достоверно чаще встречались в группе женщин с избыточной массой тела по сравнению с женщинами с нормальной массой тела (OR = 0,52; CI:0,29–0,93; p = 0,046), что может являться фактором риска развития хронических заболеваний, связанных с метаболическими нарушениями.

Таким образом, в нашем исследовании установлена взаимосвязь генетического полиморфизма *CYP19A1* с повышенной массой тела у женщин. Данные результаты могут быть связаны с вовлеченностью ароматазы в метаболизм эстрадиола, повышенный уровень которого у женщин в менопаузе определяется в жировой ткани.

Уровень эстрогенов в значительной степе-

ни связан с двумя полиморфизмами в 3'UTR rs10046 (замена с.1531 C > T) и rs4646 (замена с.1673 G > T) гена *CYP19A1*. Стоит отметить, что полиморфизмы в 3'UTR (rs10046 и rs4646) расположены на расстоянии 142 п. н. друг от друга и находятся в неравновесном сцеплении [12, 13]. В исследованиях показана ассоциация аллеля С полиморфизма rs10046 с низким уровнем эстрогена и эстрадиола, а аллель Т определяет повышенную активность ароматазы и увеличение содержания эстрогенов [14, 15]. Этот полиморфный локус связан с артериальной гипертензией у женщин, с изменением функции гипофиза у женщин в менопаузе и с риском рака молочной железы (РМЖ) [16, 17, 18]. Более того, доказано, что у пациентов с генотипом Т/Т rs10046 снижается возраст развития РМЖ до 50 лет [19, 20]. Помимо rs10046, на регу-

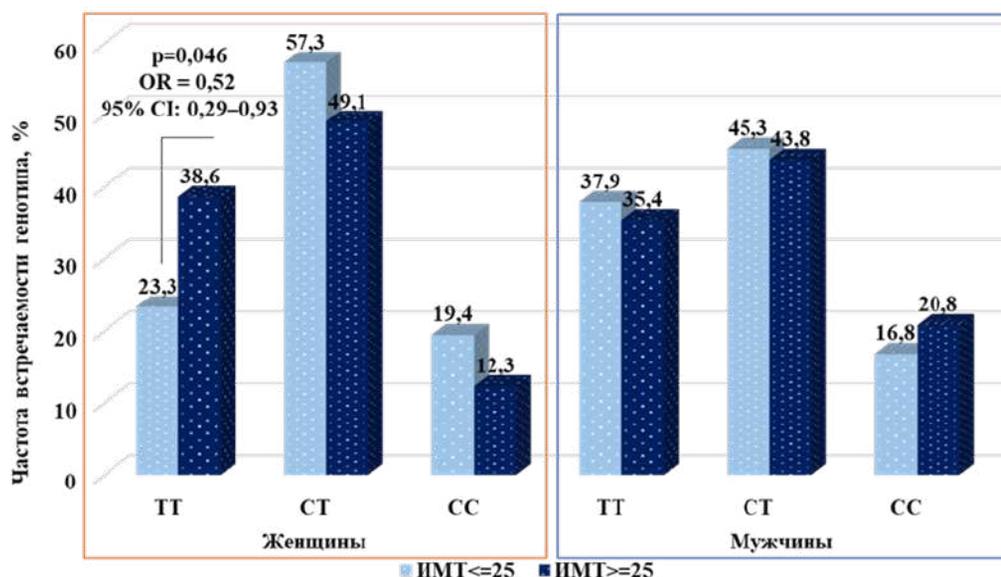


Рис. 2. Частоты полиморфных вариантов rs10046 гена *CYP19A1* в старших возрастных группах в зависимости от индекса массы тела (ИМТ) и пола

ляцию синтеза эстрогена и эстрадиола влияет rs4646. Известно, что генотипы G/T и T/T rs4646 ассоциированы со снижением риска развития РМЖ и инсульта среди лиц старше 64 лет [11, 21–22].

С возрастом возникает тенденция к ожирению и атеросклерозу, сахарному диабету 2-го типа, особенно у женщин в период постменопаузы [23–25]. Снижение содержания тестостерона и повышенный уровень эстрадиола рассматриваются в качестве основных маркеров у мужчин, способствующих развитию абдоминального ожирения и метаболического синдрома [26]. В таком случае в жировой ткани происходит повышенный синтез женских половых гормонов. В свою очередь, повышенное содержание эстрогенов в сочетании с нарушением обмена веществ является одним из факторов риска патологических состояний (метаболический синдром, дислипидемия, сердечно-сосудистые заболевания), приводящих к ранней смертности населения.

Поэтому представляет несомненный интерес поиск генетических маркеров, влияющих на липидный обмен у людей пожилого возраста.

На следующем этапе нашего исследования была проведена интегративная оценка параметров липидного обмена с данными молекулярно-генетических исследований (табл. 5, 6). Выявлена связь полиморфных вариантов гена *CYP19A1* с показателями липидного обмена

у людей с повышенной массой тела. Установлено, что у носителей генотипа CC rs10046 достоверно выше уровень ХС ЛПНП по сравнению с носителями генотипов СТ и ТТ ( $p = 0,01$ ) независимо от пола обследуемых. Эта же закономерность сохраняется и у мужчин с повышенной массой тела ( $p = 0,015$ ). Для полиморфизма rs4646 также отмечается достоверно высокий уровень ХС ЛПНП у людей с повышенной массой тела и генотипом GG по сравнению с носителями генотипов GT и TT ( $p = 0,027$ ) независимо от пола обследуемых. Кроме того, у мужчин с повышенной массой тела и генотипом GG rs4646 отмечается достоверно высокий уровень общего холестерина ( $p = 0,015$ ) ХС ЛПНП ( $p = 0,004$ ) и ХС ЛПВП ( $p = 0,013$ ) (табл. 6).

В нашем исследовании показано несомненное влияние генетического полиморфизма *CYP19A1*, участвующего в метаболизме половых гормонов, на липидный статус (общий холестерин, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП) у добровольцев старшей возрастной группы с избыточной массой тела (ИМТ  $\geq 25$ ). Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, которые показали влияние некоторых полиморфных локусов гена *CYP19A1* на изменения уровней биохимических показателей липидного обмена и на риск развития ожирения, гипертонии, различных эстроген-зависимых заболеваний у женщин

**Таблица 5**  
Уровни показателей триглицерида и холестерина в зависимости от полиморфных вариантов rs10046 и rs4646 гена *СУР19А1* (Me ± SE)

Показатель	Все				Мужчины				Женщины			
	СС	СТ	ТТ	р	СС	СТ	ТТ	р <sub>1</sub>	СС	СТ	ТТ	р <sub>2</sub>
Группа 1 (ИМТ ≥ 25)												
Общий холестерин, ммоль/л	5,72 ± 0,37	5,26 ± 0,33	5,81 ± 0,26	НЗ	5,73 ± 0,45	4,76 ± 0,42	5,48 ± 0,29	НЗ	5,71 ± 0,78	5,95 ± 0,46	6,42 ± 0,43	НЗ
Триглицериды, ммоль/л	1,56 ± 0,15	1,74 ± 0,22	1,51 ± 0,15	НЗ	1,60 ± 0,22	1,57 ± 0,22	1,46 ± 0,15	НЗ	1,47 ± 0,18	1,92 ± 0,42	1,60 ± 0,33	НЗ
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,29 ± 0,08	1,28 ± 0,12	1,43 ± 0,07	НЗ	1,25 ± 0,07	1,21 ± 0,16	1,34 ± 0,08	НЗ	1,39 ± 0,19	1,38 ± 0,19	1,57 ± 0,14	НЗ
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,74 ± 0,28	2,92 ± 0,24	3,82 ± 0,18	<b>0,01</b>	3,78 ± 0,39	2,54 ± 0,34	3,63 ± 0,21	<b>0,015</b>	3,66 ± 0,45	3,45 ± 0,24	4,18 ± 0,31	НЗ
Группа 2 (ИМТ < 25)												
Общий холестерин, ммоль/л	4,86 ± 0,29	4,95 ± 0,17	5,23 ± 0,14	НЗ	4,86 ± 0,79	4,67 ± 0,25	5,30 ± 0,18	НЗ	4,87 ± 0,27	5,28 ± 0,22	5,09 ± 0,17	НЗ
Триглицериды, ммоль/л	1,38 ± 0,21	1,13 ± 0,08	1,25 ± 0,08	НЗ	1,20 ± 0,36	1,02 ± 0,08	1,20 ± 0,08	НЗ	1,47 ± 0,26	1,26 ± 0,15	1,34 ± 0,17	НЗ
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,35 ± 0,07	1,46 ± 0,06	1,48 ± 0,04	НЗ	1,41 ± 0,04	1,46 ± 0,08	1,49 ± 0,05	НЗ	1,33 ± 0,10	1,47 ± 0,08	1,48 ± 0,09	НЗ
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,05 ± 0,21	3,11 ± 0,14	3,28 ± 0,10	НЗ	3,02 ± 0,60	2,96 ± 0,19	3,34 ± 0,14	НЗ	3,06 ± 0,17	3,29 ± 0,19	3,14 ± 0,09	НЗ

**Примечание.** р — достоверность различий между генотипами всей группы; р<sub>1</sub> — достоверность различий между генотипами у мужчин; р<sub>2</sub> — достоверность различий между генотипами у женщин; НЗ — различия между группами незначимы

**Таблица 6**  
 Уровни показателей триглицеридов и холестерина в зависимости от полиморфных вариантов rs10046 и rs4646 гена *CYP19A1*  
 (Me ± SE)

Показатель	Все			Мужчины			Женщины		
	GG	GT+TT	p	GG	GT+TT	p <sub>1</sub>	GG	GT+TT	p <sub>2</sub>
	Группа 1 (ИМТ ≥25)								
Общий холестерин, ммоль/л	5,68 ± 0,12	5,37 ± 0,36	НЗ	5,66 ± 0,22	4,52 ± 0,43	<b>0,015</b>	5,75 ± 0,44	6,44 ± 0,34	НЗ
Триглицериды, ммоль/л	1,51 ± 0,11	1,79 ± 0,23	НЗ	1,54 ± 0,11	1,53 ± 0,26	НЗ	1,45 ± 0,25	2,10 ± 0,38	НЗ
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,41 ± 0,06	1,22 ± 0,11	НЗ	1,40 ± 0,08	1,04 ± 0,10	<b>0,13</b>	1,45 ± 0,12	1,44 ± 0,19	НЗ
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,69 ± 0,15	3,03 ± 0,27	<b>0,027</b>	3,65 ± 0,18	2,49 ± 0,37	<b>0,004</b>	3,77 ± 0,29	3,71 ± 0,24	НЗ
Группа 2 (ИМТ <25)									
Общий холестерин, ммоль/л	5,11 ± 0,20	4,90 ± 0,20	НЗ	5,06 ± 0,17	4,73 ± 0,40	НЗ	5,20 ± 0,16	5,00 ± 0,22	НЗ
Триглицериды, ммоль/л	1,24 ± 0,07	1,16 ± 0,09	НЗ	1,12 ± 0,06	1,15 ± 0,21	НЗ	1,43 ± 0,16	1,17 ± 0,09	НЗ
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,46 ± 0,04	1,44 ± 0,06	НЗ	1,45 ± 0,05	1,53 ± 0,09	НЗ	1,48 ± 0,07	1,38 ± 0,08	НЗ
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,21 ± 0,09	3,08 ± 0,15	НЗ	3,22 ± 0,13	3,19 ± 0,15	НЗ	3,19 ± 0,13	3,19 ± 0,15	НЗ

**Примечание.** p – достоверность различий между генотипами всей группы; p<sub>1</sub> – достоверность различий между генотипами у мужчин; p<sub>2</sub> – достоверность различий между генотипами у женщин; НЗ – различия между группами незначимы

и мужчин, таких как рак молочной железы, рак эндометрия, рак предстательной железы [13, 27].

### Заключение

Установлены гендерные различия в распределении полиморфных вариантов rs10046 и rs4646: у мужчин младше 90 лет достоверно чаще, чем у женщин, встречались гомозиготные варианты ТТ (rs10046) и GG (rs4646), ассоциированные с повышенной активностью ароматазы (уровень значимости  $p = 0,028$  и  $p = 0,019$  соответственно). Кроме того, носительство полиморфного локуса ТТ rs10046 гена *CYP19A1* достоверно чаще встречается у женщин с избыточной массой тела (ИМТ >25) не имеющих сахарного диабета 2 типа по сравнению с женщинами с нормальной массой тела ( $p = 0,046$ ).

Выявлена связь полиморфных вариантов гена *CYP19A1* с показателями липидного обмена (триглицериды, общий холестерин, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП) у людей с повышенной массой тела.

Гендерные различия в частоте встречаемости полиморфных вариантов гена *CYP19A1*, влияние данных полиморфизмов на индекс массы тела и липидный статус добровольцев свидетельствует о возможности включения данных локусов в панели предрасположенности к дислипидемии и заболеваниям, ассоциированным с нарушением липидного статуса (сердечно-сосудистые, онкологические).

### Список использованных источников

1. Статистический бюллетень: Половозрастная структура населения Республики Беларусь на 1 января 2021г. и среднегодовая численность населения за 2020 год / Национальный статистический комитет Республики Беларусь. – Минск, 2021. – 182 с.
2. Кузьминова, Е. И. Особенности метаболизма ферментов, кодирующих метаболизм холестерина, у долгожителей Беларуси / Е. И. Кузьминова [и др.]. – Молодежь в науке–2020: тезисы докладов XVII Международной научной конференции. – Минск, 2020. – С. 219–221.
3. Воробьев П. А. Геронтология в лекциях. Клиническая геронтология / П. А. Воробьев. – М., 2004. – Т. 2. – 786 с.

4. Погодина А. Б. Основы геронтологии и гериатрии: учеб. пособ. / А. Б. Погодина, А. Х. Газимов. – Ростов н/Д: Феникс, 2007. – 252 с.

5. Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity / M. M. Smith, C. T. Minson. – J Physiol. – 2012. – Vol. 590, № 8. – P. 1 787–1 801.

6. Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue / Xu X. J. [et al.]. – J Lipid Res. – 2012. – Vol. 53, № 4. – P. 792–801.

7. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target / R. J. Santen [et al.]. – Endocr Rev. – 2009. – Vol. 30, № 4. – P. –375.

8. Aromatase expression in women's cancers / Bulun S. E., Simpson E. R. – Med. Biol. – 2008. – Vol. 630. – P. 112–132.

9. A highly complex organization of the regulatory region of the human *CYP19* (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project / S. Sebastian, S. E. Bulun. – J Clin Endocrinol Metab, 2001. – Vol. 86, № 10. – P. 4 600–4 602.

10. Grch37.ensembl.org [Electronic resource]. – Mode of access: [http://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000137869;r=15:51500254-51630807;t=ENST00000396402](http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000137869;r=15:51500254-51630807;t=ENST00000396402). – Date of access: 16.02.2023.

11. The rs4646 and rs12592697 Polymorphisms in *CYP19A1* Are Associated with Disease Progression among Patients with Breast Cancer from Different Racial/Ethnic Backgrounds / R. Armamento-Villareal [et al.]. – Front Genet. – 2016. – Vol. 7. – p. 211.

12. Михаленко, Е. П. Генетический полиморфизм ароматазы у пациенток с серозным раком яичников в Республике Беларусь / Е. П. Михаленко [и др.]. – Доклады Национальной академии наук. – 2016. – Т. 60, № 1 – С. 82–85.

13. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women / A. M. Dunning [et al.]. – J Natl Cancer Inst. – 2004. – Vol. 96. – P. 936–945.

14. Aromatase gene and osteoporosis: relationship of ten polymorphic loci with bone mineral density / J. A. Riancho [et al.]. – Bone. – 2005. – Vol. 36. – P. 917–925.

15. Association study of aromatase gene (*CYP19A1*) in essential hypertension / M. Shimodaira [et al.]. – *Int J Med Sci.* – 2008. – Vol. 5. – P. 29–35.
16. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women / F. De Castro [et al.]. – *J Natl Cancer Inst.* – 2005. – Vol. 97. – P. 152–153
17. Association of genetic polymorphisms of ER-alpha and the estradiol-synthesizing enzyme genes *CYP17* and *CYP19* with breast cancer risk in Chinese women / L. Zhang [et al.]. – *Breast Cancer Res Treat.* – 2009. – Vol. 114. – P. 327–338.
18. Elevated Aromatase (*CYP19A1*) Expression Is Associated with a Poor Survival of Patients with Estrogen Receptor Positive Breast Cancer / A. Friesenhengst [et al.]. – *Hormones & cancer.* – 2018. – Vol. 9, № 2. – P. 128–138.
19. Associations between aromatase *CYP19* rs10046 polymorphism and breast cancer risk: from a case-control to a meta-analysis of 20,098 subjects. / B. Pineda [et al.]. – *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 1–9.
20. Genetic Variant in the *CYP19A1* Gene Associated with Coronary Artery Disease / K. Bampali [et al.]. – *Genetics research international.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–5.
21. Genetic Variations of *CYP19A1* Gene and Stroke Susceptibility: A Case-Control Study in the Chinese Han Population / Q. Cai [et al.]. – *Journal of cardiovascular pharmacology.* – 2020. – Vol. 75, № 4. – P. 344–350.
22. *CYP19A1* Genetic Polymorphisms rs4646 and Osteoporosis in Patients Treated with Aromatase Inhibitor-Based Adjuvant Therapy / F. Mazzuca [et al.]. – *The Eurasian journal of medicine.* – 2016. – Vol. 48, № 1. – P. 10–14.
23. Сметник В. П. Старение репродуктивной системы женщины: клинико-гормональное обоснование стадий, терминология. – *Доктор.ру.* – 2014. – № 12. – С. 13–14.
24. Возрастные особенности метаболизма и клеточного энергообмена у женщин / Л. А. Пестряева, Т. Б. Третьякова, Е. Г. Дерябина, И. В. Данькова. – *РМЖ. Мать и дитя.* – № 5. – С. 16–18.
25. AACE Reproductive endocrinology scientific committee. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology position statement on menopause / R. H. Cobin, N. F. Goodman. – *Endocr. Pract.* – 2017. – Vol. 23, № 7. – P. 869–880.
26. Introduction to oxidative stress in biomedical and biological research / M. Breitenbach [et al.]. – *Biomolecules.* – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 1 169–1 177.
27. Sex- and Obesity-specific Association of Aromatase (*CYP19A1*) Gene Variant with Apolipoprotein B and Hypertension / N. Coban, A. Onat, F. Guclu-Geyik, G. Can, N. Erginel-Unaltuna. – *Arch Med Res.* – 2015. – Vol. 46, № 7. – P. 564–71.

I. N. Andreeva<sup>1</sup>, E. P. Mikhalenka<sup>1</sup>, E. I. Kuzminova<sup>1</sup>, O. M. Malysheva<sup>1</sup>, A. V. Bayda<sup>2</sup>,  
N. B. Kuznetsova<sup>2</sup>, A. V. Kilchevsky<sup>1</sup>

## INTEGRATIVE ASSESSMENT OF LIPID METABOLISM PARAMETERS AND *CYP19A1* GENE POLYMORPHIC VARIANTS IN THE RESIDENTS OF BELARUS BELONGING TO THE SENIOR AGE GROUP

<sup>1</sup>State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27, Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: irishka14790@mail.ru

<sup>2</sup>State Educational Institution

“Belarusian Academy of Postgraduate Education”

3/3 P. Brovki St., 220013 Minsk, the Republic of Belarus

The frequency of occurrence of polymorphic variants rs10046 and rs4646 of the *CYP19A1* gene in the residents of Belarus over 60 years old was determined using direct sequencing. Gender differences were revealed in the distribution of rs10046 and rs4646 polymorphic variants. In men under 90 years of age, homozygous TT (rs10046) and GG (rs4646) variants associated with increased aromatase activity were significantly more common than in women ( $p = 0.028$  and  $p = 0.019$ , respectively). Carriage of the polymorphic rs10046 locus of the *CYP19A1* TT genotype was found to be significantly more common in overweight women ( $BMI \geq 25$ ) compared to women with normal body weight ( $BMI < 25$ ) ( $p = 0.046$ ). An association of polymorphic variants of the *CYP19A1* gene with lipid metabolism indicators (total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol) was found in people over 60 years of age with increased body weight.

**Keywords:** longevity, aging, aromatase, direct sequencing, genetic polymorphism, *CYP19A1* gene.

Дата поступления в редакцию: 06 февраля 2023 г.

Ю. С. Станкевич<sup>1</sup>, Е. П. Михаленко<sup>1</sup>, А. Н. Щаюк<sup>1</sup>, Е. И. Кузьмина<sup>1</sup>, М. Н. Шепетько<sup>2</sup>,  
Д. В. Лапицкий<sup>2</sup>, А. В. Кильчевский<sup>1</sup>

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЛЕГКОГО И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: j.bulanovich@igc.by

<sup>2</sup>Учреждение образования  
«Белорусский государственный медицинский университет»  
Республика Беларусь, 220016, г. Минск, пр. Дзержинского, 83

Исследована частота встречаемости полиморфных вариантов генов *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs7943316, rs1001179) и *GSTP1* (rs1695) у пациентов с раком легкого (138 чел.), пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (101 чел.) и здоровых людей (192 чел.). Достоверных различий в распределении однонуклеотидных полиморфизмов в группах исследования не было обнаружено. Выявлена статистически значимая зависимость между генотипом G/G гена *GSTP1* (rs1695) и курением у пациентов с раком легкого по сравнению с контрольной группой (OR (95% CI) 2,98 (1,14–7,83)) и группой пациентов с ХОБЛ (OR (95% CI) 4,47 (1,20–16,63)). Установлено, что гомозиготные варианты A/A (rs7943316) и C/C (rs1001179) (OR (95% CI) 2,21 (1,05–4,65)) гена *CAT* ассоциированы с преимущественным развитием плоскоклеточного рака легкого в сравнении с аденокарциномой (OR (95% CI) 4,33 (1,28–14,68) и 2,21 (1,05–4,65) соответственно).

**Ключевые слова:** полиморфизм, рак легкого, хроническая обструктивная болезнь легких, антиоксидантные ферменты.

### Введение

Рак легких (РЛ) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) являются ведущими причинами заболеваемости и смертности во всем мире. ХОБЛ является третьей по частоте причиной смерти, а рак легкого — седьмой [1]. Важно отметить, что 45–63% пациентов с раком легкого во всем мире страдают ХОБЛ [2]. Несмотря на современные разработки в области диагностики и лечения, эти патологии оказывают серьезное экономическое и социальное давление на системы общественного здравоохранения [3]. Поэтому понимание механизмов развития РЛ и ХОБЛ, в особенности на молекулярном и генетическом уровнях, очень важно как для профилактики, так и для составления подходящего плана лечения [4, 5, 6].

Риск развития РЛ и ХОБЛ зависит от образа жизни, перенесенных легочных заболеваний, вирусных и бактериальных инфекций, генети-

ческой предрасположенности [7]. В 80% случаев общим экологическим фактором риска возникновения РЛ и ХОБЛ является курение, так как в сигаретном дыме присутствует множество вредных веществ: полициклические ароматические углеводороды, нитрозамины, ароматические амины, винилхлорид, радон и продукты его разложения (висмут и полоний) и т. д. Действие этих соединений может приводить к апоптозу эпителиальных клеток дыхательных путей или к повреждению ДНК [7, 8]. Помимо этого, оксиданты, содержащиеся в сигаретном дыме, выхлопных газах, лакокрасочных изделиях, увеличивают количество активных форм кислорода (АФК) в клетках, что приводит к возникновению такого состояния, как оксидативный стресс, когда уровень АФК значительно превышает антиоксидантную систему защиты клетки, что может приводить к повреждениям клеток и их содержимого [9].

Для борьбы со свободными радикалами и активными формами кислорода существует сложная система ферментов антиоксидантной защиты, которые выполняют ступенчатое преобразование АФК до молекул воды и кислорода. В ткани легкого эта система представлена следующими ферментами: супероксиддисмутазы (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPX), глутатион S-трансферазы (GST) [10, 11]. Активность этих ферментов может быть связана с полиморфизмом генов, которые их кодируют.

Цель нашего исследования — изучить генетический полиморфизм ферментов антиоксидантной защиты *GSTP1* (rs1695), *CAT* (rs7943316 и rs1001179) и *SOD2* (rs4880) у пациентов с раком легких и хронической обструктивной болезнью легких.

### Материалы и методы

В исследования включены образцы ДНК 138 пациентов с немелкоклеточным раком легкого (плоскоклеточный и аденокарцинома) в возрасте 55–90 лет и 101 пациента с ХОБЛ в возрасте 55–73 года. Контрольную группу составили 192 образца ДНК людей в возрасте 61–90 лет без клинических проявлений легочных патологий.

Сбор биологического материала проводился с соблюдением этических норм (добровольность, конфиденциальность) с письменного информированного согласия пациента.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К с последующей очисткой этанолом [12]. Для выявления полиморфизмов rs1695 гена *GSTP1* и rs7943316 гена *CAT* использовали метод ПЦР с анализом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Определение полиморфизма rs1001179 гена *CAT* производилось методом прямого секвенирования по Сэнгеру с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500. Полученные нуклеотидные последовательности анализировались с использованием программ Sequence Scanner v1.0. Для генотипирования полиморфизма rs4880 гена *SOD2* проводилась ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе BioRad CFX96 Real-time System, анализ результатов осуществлялся в компьютерной программе BioRad CFX Maestro.

В таблице 1 представлены условия ПЦР, праймеры и эндонуклеазы рестрикции, использованные в работе.

Таблица 1

Условия ПЦР, подобранные для генотипирования, и размер фрагментов

SNP	Размер фрагмента	Последовательность праймера 5'-3'	Условия амплификации	Эндонуклеазы рестрикции
<i>GSTP1</i> (A313G) rs1695	433 п. н.	F: TAGTTTGCCCAAGGTCAAG R: GCCACCTGAGGGGTAAG	3 мин — 94 °C [1 мин — 94 °C 1 мин 30 сек — 59 °C 1 мин 30 сек — 72 °C] 30 циклов 7 мин — 72 °C	Alw26I (ThermoFisher Scientific). Буфер 10× Buffer Tango (with BSA) (Thermo Fisher Scientific)
<i>CAT</i> (-21A < T) rs7943316	250 п. н.	F: AATCAGAAGGCAGTCCTCCC R: TCGGGGAGCACAGAGTGTAC	3 мин — 95 °C [30 сек — 95 °C 30 сек — 61 °C 1 мин — 72 °C] 34 цикла 5 мин — 72 °C	HinfI (New England BioLabs). Буфер CutSmart (New England BioLabs)
<i>CAT</i> (-262C < T) rs1001179	445 п. н.	F: AATCAGAAGGCAGTCCTCCC R: TCGGGGAGCACAGAGTGTAC	3 мин — 95 °C [30 сек — 95 °C 30 сек — 61 °C 1 мин — 72 °C] 34 цикла 5 мин — 72 °C	Эксонуклеаза I (Eco I) и щелочная фосфатаза (Shrimp Alkaline Phosphatase) производства «Thermo Scientific»

## Окончание таблицы 1

SNP	Размер фрагмента	Последовательность праймера 5'-3'	Условия амплификации	Эндонуклеазы рестрикции
<i>SOD2</i> (T47C) rs4880	—	F:CTGTGCTTTCTCGTCTTCAG R: CGTTGATGTGAGGTTCCAG FAM: CTGGCTCCGGTTTTGGGG VIC:CTGGCTCCGGCTTTGGGG	3 мин — 95 °C [15 сек — 95 °C 30 сек — 64 °C 30 сек — 72 °C] 40 циклов	—

Статистическая обработка данных проводилась с помощью онлайн-инструмента SNPStats.

### Результаты и обсуждение

В ходе исследования проведен анализ четырех полиморфизмов: *GSTP1* (rs1695), *CAT* (rs7943316 и rs1001179) и *SOD2* (rs4880) в трех группах — пациенты с РЛ, пациенты с ХОБЛ и люди без легочных патологий. Для определения связи полиморфных вариантов изучаемых генов с риском развития РЛ и ХОБЛ проводили сравнение с контрольной группой и групп с РЛ и ХОБЛ между собой. Кроме того, проведен анализ зависимости между полиморфизмами и статусом курения, онкоанамнезом, стадией и гистологией рака легкого. Для описания ассоциаций использовали кодоминантную и доминантную модели.

Распределение частот полиморфных вариантов исследуемых локусов во всех группах соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Частоты встречаемости генотипов в исследуемых группах представлены в таблице 2.

Во всех группах преобладающим генотипом в локусе rs4880 *SOD2* оказался промежуточный С/Т (52,6–56,7%), варианты С/С и Т/Т распределены примерно поровну. В локусах rs1001179 *CAT* и rs1695 *GSTP1* наибольшую частоту встречаемости имеют генотипы 262С/С (59,0–59,4%) и 313А/А (51,0–53,1%) соответственно, менее всего — 262Т/Т (4,7–8,2%) и 313G/Г (5,2–12,2%). При анализе полиморфизма rs7943316 гена *CAT* преобладающим оказался генотип 21Т/Т (44,7–45,8%), следующим по частоте идет промежуточный 21А/Т (38,2–41,8%), реже всего выявляется 21А/А (13,3–16,0%). При этом мы не выявили достоверных различий между исследуемыми группами при изучении взаимосвязи между стадией

онкологического заболевания и клинико-морфологическими признаками.

По результатам статистического анализа установлена ассоциация между статусом курения и полиморфными вариантами в гене *GSTP1* у пациентов с РЛ. Так, генотип G/G гена *GSTP1* достоверно чаще встречался у курящих людей с РЛ, по сравнению с контрольной группой (OR (95% CI) 2,98 (1,14–7,83)) и группой пациентов с ХОБЛ (OR (95% CI) 4,47 (1,20–16,63)). Результаты представлены на рисунке 1.

При сравнении контрольной группы и пациентов с ХОБЛ с учетом статуса курения статистически достоверных различий не обнаружено.

Также исследована зависимость между гистологией опухоли (аденокарцинома и плоскоклеточный РЛ) и полиморфными вариантами гена каталазы и показано, что плоскоклеточный РЛ чаще встречается у пациентов с генотипом –21А/А rs7943316 (OR (95% CI) 4,33 (1,28–14,68)) (рис. 2) и с генотипом –262С/С rs1001179 гена *CAT* (OR (95% CI) 2,21 (1,05–4,65)) (рис. 3).

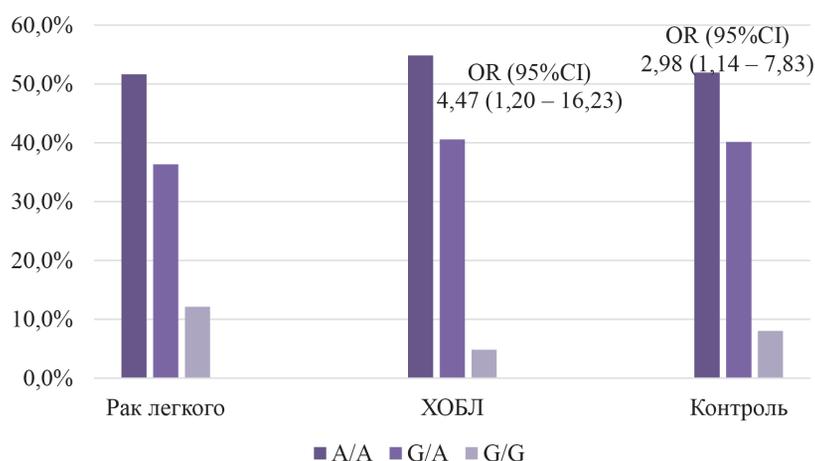
В клетках млекопитающих присутствует 3 вида супероксиддисмутаза. Cu-ZnSOD локализована в цитоплазме, ядре и межмембранном пространстве митохондрий. EsSOD (внеклеточный) находится в цитоплазматической мембране. MnSOD кодируется ядерной ДНК, находится в матриксе митохондрий и представляет собой гомомерный фермент [19]. Он является основным митохондриальным антиоксидантом в системе детоксификации клетки, который способен нейтрализовать супероксид-анион ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) в менее реактивную форму — пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Активность MnSOD значительно повышается в эпителиальных и эндотелиальных клетках, фибробластах,

Таблица 2

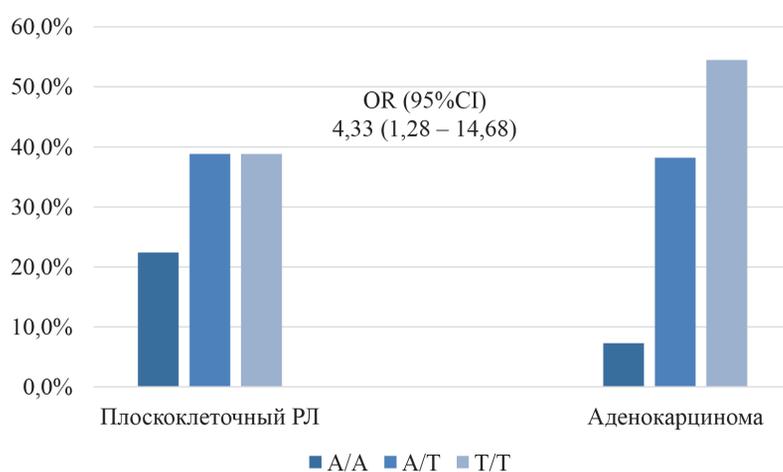
Частота встречаемости аллелей генов *SOD2*, *CAT-21*, *CAT-262*, *GSTP1* в группах исследования

Модель	Генотип	Рак легкого, %	ХОБЛ, %	Контроль, %	OR (95% CI)*	OR (95% CI)**	OR (95% CI)***
<i>SOD2 (T47C) rs4880</i>							
Кодоминантная	C/C	21,6	22,0	28,1	1,00	1,00	1,05 (0,48–2,28)
	C/T	56,7	55,0	52,6	1,40 (0,82–2,41)	1,34 (0,74–2,42)	1,10 (0,57–2,10)
	T/T	21,6	23,0	19,3	1,46 (0,75–2,83)	1,53 (0,74–3,13)	1,00
Доминантная	C/T–T/T	–	–	–	1,42 (0,84–2,38)	1,39 (0,79–2,45)	1,08 (0,58–2,01)
<i>CAT (-21A &lt; T) rs7943316</i>							
Кодоминантная	A/A	16,0	13,3	14,2	1,10 (0,57–2,13)	0,93 (0,44–1,98)	1,18 (0,54–2,62)
	A/T	38,2	41,8	41,0	0,91 (0,56–1,48)	1,02 (0,60–1,72)	0,89 (0,51–1,58)
	T/T	45,8	44,9	44,7	1,00	1,00	1,00
Доминантная	A/T–A/A	–	–	–	0,96 (0,61–1,50)	0,99 (0,61–1,62)	0,96 (0,57–1,63)
<i>CAT (-262C &lt; T) rs1001179</i>							
Кодоминантная	C/C	59,4	59,2	59,0	1,00	1,00	1,00
	C/T	35,9	32,6	35,8	1,00 (0,62–1,60)	0,91 (0,54–1,54)	1,10 (0,62–1,93)
	T/T	4,7	8,2	5,3	0,88 (0,31–2,53)	1,54 (0,58–4,13)	0,57 (0,19–1,74)
Доминантная	C/T–T/T	–	–	–	0,98 (0,62–1,55)	0,99 (0,60–1,63)	0,99 (0,58–1,69)
<i>GSTP1 (A313G) rs1695</i>							
Кодоминантная	A/A	51,9	53,1	51,0	1,00	1,00	1,00
	G/A	35,9	41,7	41,0	0,86 (0,53–1,38)	0,98 (0,59–1,62)	0,88 (0,51–1,54)
	G/G	12,2	5,2	7,9	1,52 (0,70–3,28)	0,63 (0,22–1,84)	2,40 (0,83–6,98)
Доминантная	G/A–G/G	–	–	–	0,97 (0,62–1,51)	0,92 (0,56–1,50)	1,05 (0,62–1,78)

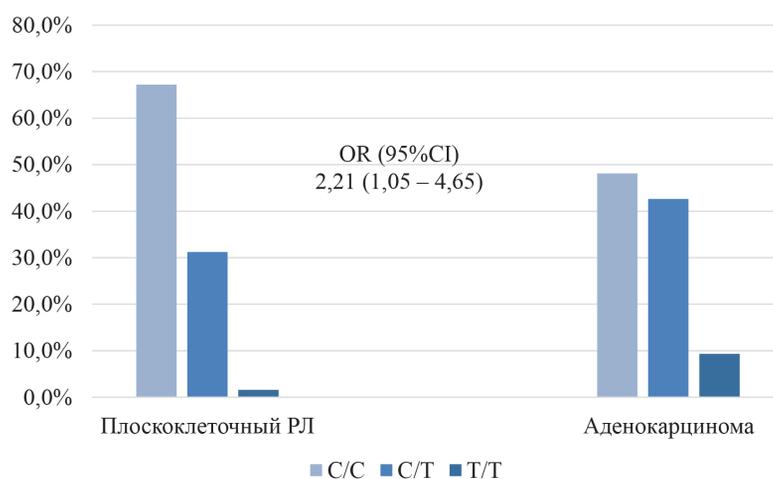
**Примечание.** OR (95% CI)\* — при сравнении пациентов с РЛ и контрольной группы; OR (95% CI)\*\* — при сравнении пациентов с ХОБЛ и контрольной группы; OR (95% CI)\*\*\* — при сравнении пациентов с РЛ и пациентов с ХОБЛ



**Рис. 1.** Частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *GSTP1* в группах сравнения с учетом статуса курения



**Рис. 2.** Частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *CAT* (rs7943316) в зависимости от гистологического типа РЛ



**Рис. 3.** Частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *CAT* (rs1001179) в зависимости от гистологического типа РЛ

альвеолах и раковых клетках легкого в результате воздействия оксидантов, сигаретного дыма, асбестной пыли, озона, фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), INF $\gamma$ , интерлекинов-1 и -6, эндотоксинов, редокс-регуляторов и во время воздействия веществ, редуцирующих тиол [14].

В геноме человека этот фермент кодируется геном *SOD2*, расположенным на 6 хромосоме и состоящим из 5 экзонов и 4 интронов. Полиморфизм rs4880 затрагивает N-конец молекулы, где происходит транзигция C > T в лидерной последовательности, вызывающая замещение аланина (GCT) валином (GTT) в 16 кодоне, что нарушает вторичную структуру  $\alpha$ -спирали MnSOD и влияет на локализацию и эффективность митохондриального транспорта данного фермента. В результате исследований было выявлено, что вариант CC (Ala) генерирует на 30–40% более активный фермент и предоставляет возможность его более эффективного импорта в митохондриальный матрикс, чем вариант TT (Val). При этом носительство генотипа TT связано с повышенным риском развития немелкоклеточного РЛ в случае наличия неблагоприятных полиморфизмов в *p53* и *XRCC1* [15].

В нашем исследовании дикий тип CC и считающийся неблагоприятным генотип TT имели примерно одинаковую частоту встречаемости среди всех групп, что позволяет сделать вывод о том, что полиморфизм rs4880 не связан с увеличением риска развития РЛ в изучаемой группе пациентов.

Каталаза относится к группе монофункциональных гем-содержащих ферментов с протетической группой в виде протопорфирина IX с ионом железа. Основная функция энзима — превращение  $H_2O_2$  в молекулы воды и кислорода, что играет большую роль в защите клеток от повреждений пероксидом водорода.  $H_2O_2$  является токсичным компонентом, так как из-за своей нестабильности быстро распадается с образованием активных форм кислорода, помимо этого он является вторичным мессенджером в передаче клеточных сигналов к изменению морфологии, пролиферации, сигнальных путей, апоптоза [16]. Таким образом, каталаза является вторым звеном детоксификации активных форм кислорода и свободных радикалов после супе-

роксидадисмутаза. Снижение функции каталазы может повлечь за собой развитие различных заболеваний, ассоциированных с прогрессированием окислительного стресса, таких, как сердечно-сосудистые и неврологические (шизофрения, болезнь Паркинсона) заболевания, диабет, рак, анемия и т. д. Помимо этого, имеются научные исследования, подтверждающие участие каталазы в процессах воспалительной реакции, метастазирования раковых опухолей и ингибирования апоптоза [17].

Ген *CAT* имеет несколько значимых замен. Одна из них находится в позиции  $-21A < T$  (rs7943316) в промоторной области и влияет на аффинность присоединения транскрипционных факторов к гену каталазы. Наличие мутантного аллеля T может приводить к присоединению неверных транскрипционных факторов, что повлечет за собой изменения в экспрессии генов и снижение активности ферментов. Все эти последствия способствуют усилению оксидативного стресса и повышению рисков развития различных заболеваний [19]. В промоторной области гена каталазы присутствует еще один полиморфизм — в позиции  $-262 C > T$  (rs1001179), который может влиять на эффективность транскрипции гена *CAT* путем модификации участка присоединения транскрипционных факторов, что ведет к усиленной активности базальной каталазы в клетках различных типов и в крови. Исследования показали, что дикий тип гена (CC) ассоциирован с более высокой активностью фермента, по сравнению с CT и TT [18].

В нашем исследовании показана взаимосвязь между SNP гена каталазы и гистологическим типом РЛ. При проведении статистического анализа установлено, что плоскоклеточный РЛ чаще встречается у пациентов с генотипом 21A/A rs7943316 и 262C/C rs1001179.

Фермент глутатион-S-трансфераза p1 входит в состав одного из механизмов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков и локализуется в легочной ткани, его основными субстратами являются экзогенные токсины сигаретного дыма (акролеин, бензапирен), красок (бензофенантрен, бензохризен) и эндогенные токсины, образующиеся при перекисном окислении липидов (4-гидроксиноненал), окислении катехоламинов (амино-, допа- и норадренохромы) и окислительных поврежде-

ниях ДНК (аденин и тимин пропены) [13].

Ген *GSTP1* располагается в 13 локусе 11 хромосомы. Один из полиморфизмов находится в 5 экзоне этого гена и представляет собой замену А > G в 313 нуклеотиде (АТС→GТС), что влечет за собой замену изолейцина (Ile) на валин (Val). Модификация происходит очень близко к активному центру белка, соответственно, сильно влияет на его каталитическую активность. Наличие аллеля G значительно снижает активность фермента и увеличивает риск мутаций в ДНК. В результате ухудшается выведение гидрофильных метаболитов и увеличивается риск развития рака, особенно при наличии генетической предрасположенности к нему [20].

По результатам статистического анализа выявлена взаимосвязь между статусом курения и полиморфными вариантами гена *GSTP1* при сравнении группы пациентов с РЛ с контрольной группой и пациентами с ХОБЛ. Так, наличие полиморфной замены G/G в этом гене у курящих людей ведет к увеличению рисков возникновения РЛ.

### Заключение

Изучены полиморфные варианты генов *SOD2*, *CAT* и *GSTP1* у пациентов с раком легкого, пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и у людей, не имеющих легочных патологий. В результате статистического анализа выявлено, что вариант G/G гена *GSTP1* ассоциирован с увеличением риска возникновения РЛ у курящих людей. При этом связи полиморфизмов с возникновением ХОБЛ обнаружено не было.

Установлена взаимосвязь между полиморфными локусами гена каталазы и гистологическим типом РЛ: пациенты с вариантом 21A/A rs7943316 и 262C/C rs1001179 имеют большую вероятность диагностирования плоскоклеточного РЛ, чем аденокарциномы.

### Список использованных источников

1. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung [et al.]. – *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – Vol. 71, № 3. – P. 209–49.

2. Young, R. P. The potential impact of chronic obstructive pulmonary disease in lung cancer

screening: implications for the screening clinic / R. P. Young, R. Hopkins. – *Expert Rev Respir Med.* – 2019. – Vol. 13, № 8. – P. 699–707.

3. Prevalence of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis / G. Zhao [et al.]. – *J. Front Oncol.* – 2022. – Vol. 12:947981.

4. De Sousa, V. M. L. Heterogeneity in Lung Cancer / V. M. L. de Sousa, L. Carvalho. – *Pathobiology.* – 2018. – Vol. 85, № 1–2. – P. 96–107.

5. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and lung cancer: common pathways for pathogenesis / B. A. Parris [et al.]. – *J. Thorac Dis.* – 2019. – Vol. 17. – P. 2 155–2 172.

6. Molecular links between COPD and lung cancer: new targets for drug discovery/ G. Caramori [et al.]. – *Expert Opin Ther Targets.* – 2019. – Vol. 23, № 6. – P. 539–553.

7. Schabath, M. B. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer / M. B. Schabath, M. L. Cote. – *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2019. – Vol. 28, № 10. – P. 1 563–1 579.

8. Dela Cruz, C. S. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention / C. S. Dela Cruz, L. T. Tanoue, R. A. Matthay. – *Clinics in Chest Medicine.* – 2011. – Vol. 32, № 4. – P. 605–644.

9. Defining ROS in biology and medicine / R. Li [et al.]. – *Reactive Oxygen Species.* – 2016. – Vol. 1, № 1. – P. 9–21.

10. Oxidative, inflammatory, genetic, and epigenetic biomarkers associated with chronic obstructive pulmonary disorder / T. Aggarwal [et al.]. – *J. Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 234, № 3. – P. 2 067–2 082.

11. Update in chronic obstructive pulmonary disease: role of antioxidant and metabolizing gene polymorphisms / L. Ramzi [et al.]. – *Exp Lung Res.* – 2011. – Vol. 37, № 6. – P. 364–75.

12. Mathew, C. C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA / C. C. Mathew. – *Methods in Molecular Biology.* – Clifton: Human Press. – 1984. – Vol. 2, № 4. – P. 31–34.

13. Hayes, J. D. Glutathione S-Transferase polymorphisms and their biological consequences / J. D. Hayes, R. C. Strange. – *Pharmacology.* – 2000. – № 61. – P. 154–166.

14. Mechanisms of oncogene-induced replication stress: Jigsaw falling into place / P. Kotsantis [et al.]. – *Cancer Discovery.* – 2018. – Vol. 8, № 5. – P. 537–555.

15. Miao, L. Regulation of superoxide dismu-

tase genes: implications in diseases / L. Miao, D.K.St. Clair. – *Free Radical Biology and Medicine*. – 2009. – Vol. 47, № 4. – P. 344–356.

16. Glorieux, C. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach / C. Glorieux, P.B. Calderon. – *Biological Chemistry*. – 2017. – Vol. 398, № 10. – P. 1 095–1 108.

17. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases / A. Nandi [et al.]. – *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Vol. 2 019. – P. 19.

18. Human catalase, its polymorphisms regulation and changes of its activity in different dis-

eases / J. Kodidkova [et al.]. – *Folia Biologica*. – 2014. – Vol. 60, № 1. – P. 153–167.

19. A study of Catalase gene promoter polymorphism –21A/T (rs7943316) in healthy Pakistani population / S. N. Nawab [et al.]. – *Pakistan Journal of medical sciences*. – 2017. – Vol. 33, № 6. – P. 1 521–1 524.

20. Mandal, R. D. Glutaione S-Transferase P1 313 (A > G) Ile105Val polymorphism contributes to cancer susceptibility in Indian population: a meta-analysis of 39 case-control studies / R. K. Mandal, R. D. Mittal. – *Indian journal of clinical biochemistry*. – 2020. – Vol. 35, № 1. – P. 8–19.

Y. S. Stankevich<sup>1</sup>, E. P. Mikhalenka<sup>1</sup>, A. N. Shchayuk<sup>1</sup>, A. I. Kusminova<sup>1</sup>, M. N. Shapetska<sup>2</sup>,  
D. V. Lapitsky<sup>2</sup>, A. V. Kilchevsky<sup>1</sup>

## GENETIC POLYMORPHISM OF ANTIOXIDANT PROTECTION ENZYMES IN PATIENTS WITH LUNG CANCER AND CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

<sup>1</sup>State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: j.bulanovich@igc.by

<sup>2</sup>Educational Establishment

“Belarusian State Medical University”

83 Dzerzhinsky Ave., 220016 Minsk, the Republic of Belarus

The frequency of occurrence of polymorphic variants of *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs7943316, rs1001179) and *GSTP1* (rs1695) genes was studied in 138 patients with lung cancer, 101 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and 192 healthy individuals. The comparison of SNP's distribution in research groups did not show statistically reliable results. An increased risk of lung cancer is associated with smoking and the G/G genotype of the *GSTP1* (rs1695) gene in the group of lung cancer patients compared with the control (OR (95% CI) 2.98 (1.14–7.83)) and COPD patients (OR (95% CI) 4.47 (1.20–16.63)). It was established that homozygous variants A/A (rs7943316) and C/C (rs1001179) (OR (95% CI) 2.21 (1.05–4.65)) of the *CAT* gene are associated with the predominant development of squamous cell lung cancer in comparison with adenocarcinoma (OR (95% CI) 4.33 (1.28–14.68) and 2.21 (1.05–4.65) correspondingly).

**Keywords:** polymorphism, lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease, antioxidant enzymes.

Дата поступления в редакцию: 03 февраля 2023 г.

О. Д. Левданский<sup>1</sup>, Р. С. Шулинский, Е. А. Мишук<sup>1</sup>

## ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ CNV АНАЛИЗА ДЛЯ ПОИСКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К НАСЛЕДСТВЕННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: o.liaudanski@igc.by

В рамках исследования был проведен CNV анализ данных высокопроизводительного секвенирования 269 пациентов из четырех выборок пациентов (некоронарогенные заболевания сердца; дети, рожденные в результате преждевременных родов; эпилепсия; нефропатология) и контрольной группы. Определены множественные CNV, ассоциированные с каждым типом патологии. Выявленные CNV представляют собой потенциальные маркеры для определения предрасположенности к данным типам заболеваний.

**Ключевые слова:** CNV анализ, биоинформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования, маркеры предрасположенности к заболеваниям.

### Введение

Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования внесло колоссальный вклад в диагностику наследственных заболеваний. Снижение стоимости получения полногеномных и экзомных последовательностей ДНК сделало доступными такие данные для огромного числа пациентов с подозрениями на генетическую патологию. Следует уточнить, что стандартные протоколы обработки данных высокопроизводительного секвенирования, как правило, позволяют идентифицировать только однонуклеотидные замены (SNP) и короткие инсерции и делеции. При этом для существенного количества пациентов не удастся обнаружить патогенную мутацию, обуславливающую развитие заболевания. Это косвенно указывает на возможность наличия других генетических причин, отвечающих за формирование конкретного патологического фенотипа. Одной из таких причин может являться изменение числа копий протяженных участков ДНК (от нескольких сотен до миллионов п. н.) вследствие делеций или дупликаций, так называемые CNV (от англ. copy number variation). Полиморфизм такого рода представляет собой тип структурных вариаций с аномальным числом копий фрагментов, как правило, приводящих к увеличению (дупликации и ин-

серционные транспозиции) или уменьшению (делеции) уровня экспрессии определенных белков. В среднем в геноме человека может содержаться несколько тысяч CNV, суммарная протяженность которых может измеряться мегабазами [1]. CNV могут затрагивать один или несколько генов и представлять собой рецессивный или доминантный аллель, который может включать кодирующие регионы генов или влиять на уровень их экспрессии. К настоящему времени удалось продемонстрировать весомый вклад CNV в генетическое разнообразие человеческого генома [2], равно как и в развитие целого ряда заболеваний, таких как аутизм [3], шизофрения [4], эпилепсия [5] и др. Экспериментальные методы выявления протяженных участков ДНК с измененным числом копий финансово затратны, что обусловило разработку программных средств для поиска CNV в данных полногеномного или экзомного секвенирования. В результате создано большое количество программных продуктов, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки, зависящие от используемых подходов и алгоритмов.

Существует четыре основных подхода для обнаружения и анализа CNV, на которых базируется большинство программ, осуществляющих данный процесс: парные прочтения,

разделение прочтений, глубина прочтений и сборка контигов [6].

Самые первые программы для поиска CNV были разработаны с применением метода парных прочтений. Данный подход базируется на сравнении среднего размера вставки между прочтениями из одной пары с ее реальным размером. При парно-концевом секвенировании предполагается определенное распределение размеров вставки, и значительные отклонения от такового могут свидетельствовать о наличии в данном регионе CNV. Основанные на данном подходе методы позволяют идентифицировать инсерции и делеции среднего размера, игнорируя таковые небольшого размера в силу неспособности отличить их от фоновых колебаний [7]. Кроме того, такие методы не применимы к однородным регионам, содержащим повторяющиеся последовательности. К программам, использующим данный подход, относятся PEMer [8], Ulysses [9] и BreakDancer [10].

Подход разделения прочтений использует прочтения парно-концевого секвенирования, для которых только одно прочтение из пары точно картируется на референсный геном, в то время как второе не удается картировать либо частично, либо полностью. Некартированные прочтения указывают на потенциальную границу CNV локуса. Картирование прочтений вокруг потенциальных границ CNV позволяет определить начало и конец локуса с точностью до одного нуклеотида. Программы, основанные на разделении прочтений, такие как Pindel [11], Gustaf [12], SVseq2 [13] и Prism [14], испытывают определенные трудности с обнаружением структурных перестроек большого размера, разве что за исключением последней.

Следующий подход к обнаружению CNV основан на гипотезе о наличии корреляции между глубиной прочтения определенного региона генома и количеством копий данного региона. В зависимости от дизайна исследования такие методы делятся на три типа: с одним образцом, с парными случай/контроль образцами и с большой популяционной выборкой образцов. В первом случае, в силу отсутствия других вариантов, определяется абсолютное значение числа копий. Во втором — количество копий относительно контрольного образца. В третьем варианте для сравнения используются средние популяционные значения. В отличие от двух

предыдущих подходов, данный позволяет не только определять место локализации CNV, но и точное число копий. Кроме того, данный подход весьма эффективен для обнаружения CNV большого размера, что может представлять определенные трудности для программ, основанных на первых двух подходах. Определение CNV с помощью глубины прочтения включает следующие шаги: выравнивание прочтений на референсный геном, подсчет количества прочтений с определенным окном, нормализация полученных значений для избавления от потенциальных смещений в силу различий в содержании GC и возможных повторов и затем вызов и фильтрация статистически значимых отклонений от ожидаемых значений глубины прочтения [14]. Данный подход реализован во множестве программ, среди которых можно упомянуть BIC-seq Perl [16], cm.MOPS [17] и CNVnator [18].

Четвертый подход — сборка контигов — в теории позволяет определять все возможные типы полиморфных локусов, включая CNV, при условии достаточной длины и точности прочтений. Основанные на данном подходе программы изначально осуществляют сборку контигов/скаффолдов, которые затем сравниваются с референсной последовательностью для обнаружения структурных вариантов. Тем не менее данный метод редко применяется для обнаружения CNV в силу чрезвычайно высокой требовательности к вычислительным мощностям. К тому же эукариотические геномы содержат значительную долю повторов, которые осложняют работу программ, основанных на сборке контигов, делая их менее точными. Кроме этого, такие программы способны обнаруживать только CNV в гомозиготном состоянии [16]. Примером программы, основанной на сборке контигов, может послужить Magnolya [19].

Каждый из перечисленных выше подходов имеет свои преимущества и недостатки. В то время как основанные на глубине прочтения методы наилучшим образом подходят для определения точного значения числа копий, они испытывают затруднения с определением CNV небольшого размера. Программы, использующие подход парных прочтений, имеют меньшую чувствительность при определении вариаций в регионах, содержащих повторы.

Эта же проблема характерна и для методов, основанных на разделении прочтений, хотя они и позволяют определять точные начала и окончания CNV, но являются сильно зависимыми от длины прочтений. Сборка контигов не требует наличия референсного генома, но весьма зависима от вычислительных мощностей и также неэффективна в регионах с большим количеством повторов. Ввиду этого были разработаны комплексные методы, основывающиеся на двух и более подходах. Например, комбинирование методов парных прочтений и их глубины позволит точно определять как само наличие CNV больших размеров, так и их точную локализацию. Комбинирование нескольких методов в рамках одного программного продукта позволяет в значительной степени снизить количество выявляемых ложноположительных CNV по сравнению с результатами работы программ, основанных на отдельных подходах. В качестве примера можно привести такие программы, как Gindel [20], Hydra-Multi [21], LUMPY [22], CNVkit [23] и ClinCNV [24].

### Материалы и методы

В исследование были включены данные высокопроизводительного секвенирования (NGS) 269 образцов ДНК. В выборке были представлены образцы пациентов со следующими патологиями: эпилепсия — 52 образца, секвенированные с использованием панели Illumina TruSight One Expanded; некоронарогенные заболевания сердца — 31 образец, секвенированный с использованием панели Illumina TruSight One Expanded; почечная недостаточность — 68 образцов, секвенированных с использованием панели Illumina Full Exome; невынашивание беременности (недоношенные дети) — 55 образцов, секвенированных с использованием панели Illumina Full Exome; без патологий — 63 образца, секвенированных с использованием панели Illumina Full Exome и Illumina TruSight One Expanded.

Анализ качества прочтений с последующим триммингом некачественных оснований проводили в программах FastQC и Trimmomatic соответственно [25, 26]. Картирование прочтений на референсный геном GRCh37 [GCF\_000001405.13] было осуществлено с использованием программы BWA [27]. Работу с форматами данных вырав-

нивания проводили в программах samtools и bedtools [27, 28]. Добавление информации о библиотеке секвенирования, имени образца и платформы секвенирования проводили с использованием программы GATK, пакет AddOrReplaceReadGroups [29].

Вызов количества копий фрагментов (CNV) проводили в программе ClinCNV. Для этого было необходимо сгруппировать образцы по технически схожим признакам: панелям секвенирования, среднему покрытию, качеству и др. Далее полученные кластеры были процессированы на ClinCNV с последующим получением количества копий фрагментов.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием языка программирования R, пакет CNVRanger [30], используя стандартную линейную регрессию фенотипа в зависимости от частоты вариантов копий фрагментов. Для локусов CNV, состоящих из нескольких сегментов, значение  $P$  выбирали, используя либо сегмент с минимальным значением  $P$ , либо тот, в котором частота CNV была максимальной. Тестирование проводили с использованием метода частот ложных обнаружений (FDR). Визуализацию полученных результатов, а также форматирование таблиц с результатами проводили с использованием языка Python, библиотеки numpy, seaborn, pandas [31–33]. Скрипты, разработанные в ходе данного исследования, можно найти по ссылке <https://github.com/IGC-bioinf/cnv>.

### Результаты и обсуждение

CNV анализ данных NGS пациентов с невынашиванием при беременности после поправки на множественные сравнения выявил 93 локуса, ассоциированных с данной патологией. Размер вариативных локусов составил от 127 до 5 227 597 п. н. при среднем значении в 130 310,1 п. н. (стандартное отклонение средней составило 594 479,7). В таблице 1 представлены 20 CNV, для которых показан наиболее высокий уровень значимости при сравнении с контрольной выборкой, а на рисунке 1 представлено распределение степени вероятности ошибки при тестировании гипотезы об отсутствии связи обнаруженных CNV с риском развития невынашивания по хромосомам.

Значимую ассоциацию с риском развития невынашивания при беременности продемонстрировал целый ряд генов белков, содержащих домен «цинкового пальца», локализованных на 19 хромосоме — из 20 локусов 15 включают гены данного типа (*ZNF726*, *ZNF729*, *ZNF431*, *ZNF254*, *ZNF208*, *ZNF257*, *ZNF708*, *ZNF99*, *ZNF429*, *ZNF91*, *ZNF714*,

*ZNF253*, *ZNF492*, *ZNF682*, *ZNF493*). Домен «цинкового пальца» предназначен для узнавания и связывания определенной последовательности ДНК и, как правило, содержится в различных транскрипционных факторах. Обращает на себя внимание тот факт, что дупликации во всех генах чаще встречались в контрольной группе, т. е. являлись протек-

Таблица 1

Наиболее значимые CNV у пациентов, рожденных в результате преждевременных родов

№	Начало	Конец	Размер	Ген	Тип	P-value	Частота у пациентов	Частота у контролей
6	56463273	56470563	7 290	<i>DST</i>	DEL	5,76E-13	0,655	0,048
19	24309630	24310494	864	<i>ZNF254</i>	DUP	8,72E-11	0	0,143
19	23542659	23543113	454	<i>ZNF91</i>	DUP	1,21E-10	0	0,27
19	21365740	21366839	1 099	<i>ZNF431</i>	DUP	2,20E-10	0	0,159
19	21476074	21477102	1 028	<i>ZNF708</i>	DUP	4,14E-10	0	0,159
19	22496625	22499978	3 353	<i>ZNF729</i>	DUP	4,83E-10	0,018	0,159
19	24115733	24116621	888	<i>ZNF726</i>	DUP	7,60E-10	0	0,159
19	22940046	22941724	1 678	<i>ZNF99</i>	DUP	1,18E-09	0,018	0,127
19	22846601	22868418	21 817	<i>ZNF492</i>	DUP	1,74E-09	0,036	0,079
19	21719832	21720732	900	<i>ZNF429</i>	DUP	2,96E-09	0	0,19
1	16892127	16893846	1 719	<i>NBPF1</i>	DUP	5,49E-09	0	0,175
1	39775915	39800062	24 147	<i>MACF1</i>	DEL	8,45E-09	0,564	0,048
12	31256798	31301056	44 258	<i>DDX11</i>	DEL	1,23E-08	0,6	0,016
19	22271216	22272244	1 028	<i>ZNF257</i>	DUP	1,54E-08	0,018	0,095
19	21605713	21607639	1 926	<i>ZNF493</i>	DUP	5,15E-08	0,018	0,127
19	20044585	20045479	894	<i>ZNF93</i>	DUP	5,86E-08	0	0,159
11	85422154	85438033	15 879	<i>SYTL2</i>	DUP	6,47E-08	0	0,032
19	23557388	23836618	279 230	<i>ZNF675, ZNF91</i>	DUP	9,65E-08	0	0,206
19	21239745	21240520	775	<i>ZNF430</i>	DUP	1,43E-07	0	0,206
19	23836914	23837063	149	<i>ZNF675</i>	DUP	1,85E-07	0	0,175

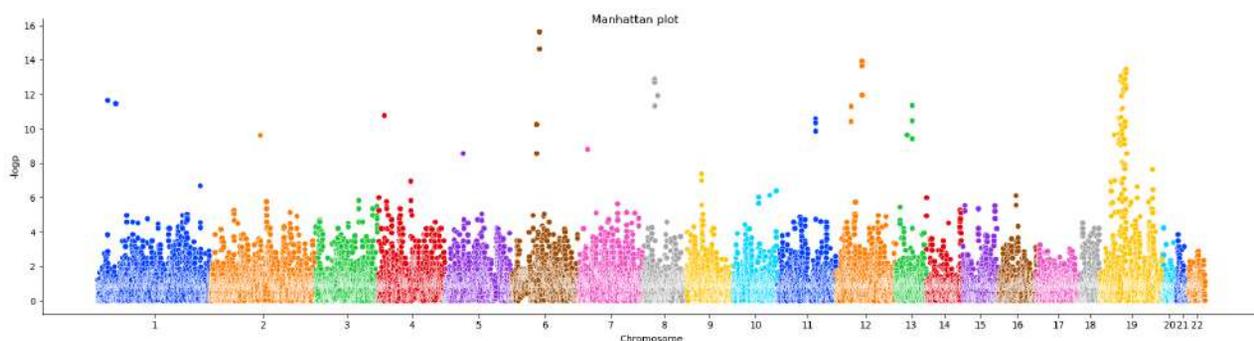


Рис. 1. Результаты полноэкзомного ассоциативного CNV анализа и риска развития невынашивания при беременности. На горизонтальной оси указан номер хромосомы, на вертикальной оси — статистическая значимость протестированных маркеров

тивными, а делеции — у пациентов, т. е. ассоциировались с невынашиваемостью (табл. 1). Это касалось и делеций в генах белков «цинковых пальцев», которые также обнаруживались с большей частотой в группе пациентов (табл. 2). Аналогичная взаимосвязь была показана для CNV в пяти других генах. Так, делеции в генах *DST* (кодирует белок дистонин, представитель семейства белков плакинов, входящих в состав межклеточных соединительных комплексов и цитоскелета, некоторые изоформы которого, экспрессируемые в тканях нервной и мышечной систем, отвечают за присоединение промежуточных филаментов с актином цитоскелета), *MASF1* (кодирует фактор сшивания микротрубочек

актина 1, принимающий участие в формировании связок между различными элементами цитоскелета) и *DDX11* (кодирует белок, обладающий свойствами ДНК-зависимой АТФазы и АТФ-зависимой ДНК хеликазы, принимающий участие репликации и репарации ДНК, организации хроматина и синтезе рибосомальной РНК) с большей частотой встречались среди пациентов. А дупликации в генах *SYTL2* (синаптотагмин-подобный белок 2, принимающий участие в транспорте везикул) и *NBPF1* (белок из семейства точек прерывания нейробластомы 5, для которого показана связь с развитием нейробластомы и хронического цервицита) были выявлены только в контрольной группе.

Таблица 2

Делеции в генах белков, содержащих домен «цинкового пальца», у пациентов, рожденных в результате преждевременных родов

№	Начало	Конец	Размер	Ген	Тип	P-value	Частота у пациентов	Частота у контролей
19	21909483	21910209	726	<i>ZNF100</i>	DEL	1,54E-03	0,545	0,143
4	289757	436397	146 640	<i>ZNF732</i> , <i>ZNF141</i> , <i>ZNF721</i>	DEL	2,45E-03	0,618	0,175
19	22362750	22363793	1 043	<i>ZNF676</i>	DEL	4,12E-03	0,564	0,143
4	436853	437309	456	<i>ZNF721</i>	DEL	1,37E-02	0,564	0,159
19	19822304	19822739	435	<i>ZNF14</i>	DEL	1,68E-02	0,273	0
19	44335461	44352330	16 869	<i>ZNF283</i>	DEL	3,14E-02	0,364	0,063

CNV анализ данных NGS пациентов с эпилепсией после поправки на множественные сравнения выявил 53 локуса, ассоциированных с данной патологией. Размер вариативных локусов составил от 410 до 2 282 701 п. н. при среднем значении в  $153\ 207,7 \pm 382\ 579,1$  п. н. В таблице 3 представлены 20 CNV, для которых показан наиболее высокий уровень значимости при сравнении с контрольной выборкой, а на рисунке 2 представлено распределение степени вероятности ошибки при тестировании гипотезы об отсутствии связи обнаруженных CNV с риском развития эпилепсии.

Среди 20 CNV локусов, показавших наибольшую ассоциацию с вероятностью развития эпилепсии, 16 оказались делециями, которые достоверно чаще встречались в группе пациентов. Наибольшую степень

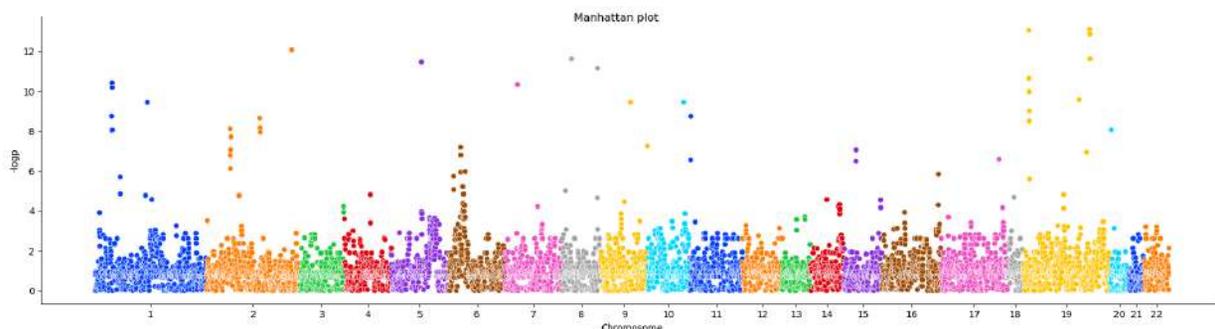
ассоциации продемонстрировали делеции в генах *SHANK1* (кодирует белок из семейства SHANK, представители которого участвуют в развитии и функционировании нейронных синапсов; делеции в данном гене увеличивают риск развития аутизма у мужчин) и *GPR124* (кодирует рецептор, являющийся частью сигнального пути Wnt7 в эндотелиальных клетках мозга, и ассоциирован с развитием билатеральной фронтопариентальной микрогирии). Сопоставимый уровень значимости был показан для делеции, затрагивающей гены *ADAMTS19* (кодирует белок из семейства дизинтегрин и металлопротеаз с тромбоспондиновым мотивом, ассоциированный с кардиоваскулярной дисплазией 2 типа и дискретным субаортальным стенозом) и *CHSY3* (хондроитин сульфат

синтаза 3, для которой показана связь с опухолевым кальцинозом и несовершенным амелогенезом). Дупликация в гене *PLCB2* также с большей частотой была выявлена среди пациентов, а оставшиеся три были выявлены только в группе контролей.

**Таблица 3**

Наиболее значимые CNV у пациентов с эпилепсией

№	Начало	Конец	Размер	Ген	Тип	P-value	Частота у пациентов	Частота у контролей
19	51171214	51172399	1 185	<i>SHANK1</i>	DEL	1,32E-13	0,56	0,03
8	37654777	37699595	44 818	<i>GPR124</i>	DEL	2,37E-12	0,5	0
5	128796784	129241060	444 276	<i>ADAMTS19, CHSY3</i>	DEL	3,47E-12	0,52	0,016
8	145152249	145550309	398 060	<i>SCXA, CYC1, SHARPIN, MAF1, FAM203A, HEATR7A, DGATI, HSF1, BOP1</i>	DEL	6,87E-12	0,54	0,16
10	120789303	120789752	449	<i>NANOS1</i>	DEL	3,61E-10	0,44	0,016
1	115053297	115053707	410	<i>TRIM33</i>	DEL	3,61E-10	0,44	0
2	160182092	160255422	73 330	<i>BAZ2B</i>	DEL	6,27E-09	0,40	0,063
2	160734833	162265428	1 530 595	<i>ITGB6, RBMS1, TANK, PSMD14, LY75, PLA2R1</i>	DEL	6,27E-09	0,40	0,048
2	74128428	74143801	15 373	<i>ACTG2</i>	DEL	7,58E-09	0,44	0,016
20	2082674	2083713	1 039	<i>STK35</i>	DEL	8,62E-09	0,39	0
6	29855732	29911322	55 590	<i>HLA-A</i>	DUP	6,45E-08	0	0,14
19	49138969	49140261	1 292	<i>DBP</i>	DEL	1,14E-07	0,35	0
6	29911888	29913068	1 180	<i>HLA-A</i>	DUP	1,56E-07	0	0,16
15	40581462	40588603	7 141	<i>PLCB2</i>	DUP	3,25E-07	0,06	0
6	32486270	32487438	1 168	<i>HLA-DRB5</i>	DEL	1,05E-06	0,5	0,38
6	31322249	31324986	2 737	<i>HLA-B</i>	DEL	6,03E-06	0,48	0,13
6	31996459	31997585	1 126	<i>C4A</i>	DEL	1,42E-05	0,54	0,21
4	88258356	88537620	279 264	<i>DSPP, SPARCL1, NUDT9, HSD17B11</i>	DUP	1,53E-05	0	0,29
18	23806887	24128510	321 623	<i>KCTD1, TAF4B</i>	DEL	2,03E-05	0,27	0
8	144772176	145141030	368 854	<i>GRINA, SPATC1, GPAAI, EXOSC4, CCDC166, PARP10, MAPK15, FAM83H, PUF60, NRBP2, EPPK1, PLEC, ZNF707, SCRIB, OPLAH</i>	DEL	2,16E-05	0,56	0,16



**Рис. 2.** Результаты полноэкзомного ассоциативного CNV анализа и риска развития эпилепсии. На горизонтальной оси указан номер хромосомы, на вертикальной оси — статистическая значимость протестированных маркеров

Таким образом, было показано, что делеции, затрагивающие широкий спектр генов, являются маркерами риска развития эпилепсии, в то время как дупликации некоторых генов, встречающиеся в человеческой популяции, у пациентов с эпилепсией практически не обнаруживаются.

CNV анализ данных NGS пациентов с патологией почек выявил 62 локуса, ассоциированных с данным типом заболеваний. Размер вариативных локусов составил от 153 до 325 418 п. н. при среднем значении в  $32\,637,92 \pm 63\,330,08$  п. н. В таблице 4 представлены 20 CNV, для которых показан наиболее высокий уровень значимости при сравнении с контрольной выборкой, а на ри-

сунке 3 представлено распределение степени вероятности ошибки при тестировании гипотезы об отсутствии связи обнаруженных CNV с риском развития патологии почек.

Из 20 наиболее ассоциированных с патологией почек локусов 19 оказались дупликациями, преимущественно представленными в контрольной группе. Как и в случае с невынашиванием при беременности, в перечень попал целый ряд генов белков, содержащих домен «цинкового пальца». Единственной представленной делецией в списке оказалась таковая в гене *ZBED6*, который также кодирует белок, содержащий домен «цинкового пальца». Данная делеция с достоверно большей частотой была представлена в группе пациентов.

**Таблица 4**

Наиболее значимые CNV у пациентов с патологией почек

№	Начало	Конец	Размер	Ген	Тип	P-value	Частота у пациентов	Частота у контролей
13	50140906	50466324	325 418	<i>RCBTB1, ARL11, EBPL, KPNA3</i>	DUP	6,47E-09	0	0,143
10	131761971	131906137	144 166	<i>EBF3</i>	DUP	2,10E-07	0	0,206
19	41387924	41415982	28 058	<i>CYP2A7</i>	DUP	8,53E-06	0	0,143
19	23542659	23543113	454	<i>ZNF91</i>	DUP	2,58E-05	0	0,27
1	110230404	110235924	5 520	<i>GSTM1</i>	DUP	9,48E-05	0	0,143
19	23543717	23544321	604	<i>ZNF91</i>	DUP	2,82E-04	0	0,222
3	195506852	195513872	7 020	<i>MUC4</i>	DUP	4,24E-04	0	0,254
1	203768267	203768855	588	<i>ZBED6</i>	DEL	4,71E-04	0,471	0,079
4	88535190	88537469	2 279	<i>DSPP</i>	DUP	1,18E-03	0,029	0,286
10	124344756	124352121	7 365	<i>DMBT1</i>	DUP	1,96E-03	0	0,159

Окончание таблицы 4

№	Начало	Конец	Размер	Ген	Тип	P-value	Частота у пациентов	Частота у контролей
19	23836026	23836618	592	ZNF675	DUP	2,27E-03	0	0,206
2	132021959	132200660	178 701	POTEE, WTH3DI	DUP	2,28E-03	0,029	0,19
19	22940199	22941724	1 525	ZNF99	DUP	2,78E-03	0	0,127
14	105418286	105419336	1 050	AHNAK2	DUP	3,21E-03	0,088	0,365
19	22497084	22499978	2 894	ZNF729	DUP	3,34E-03	0	0,159
19	20044585	20045032	447	ZNF93	DUP	3,70E-03	0,015	0,159
7	100348797	100350701	1 904	ZAN	DUP	4,34E-03	0	0,254
14	105414686	105415286	600	AHNAK2	DUP	4,39E-03	0,044	0,254
19	21365740	21366839	1 099	ZNF431	DUP	4,72E-03	0	0,159
19	21239745	21240520	775	ZNF430	DUP	4,89E-03	0	0,206

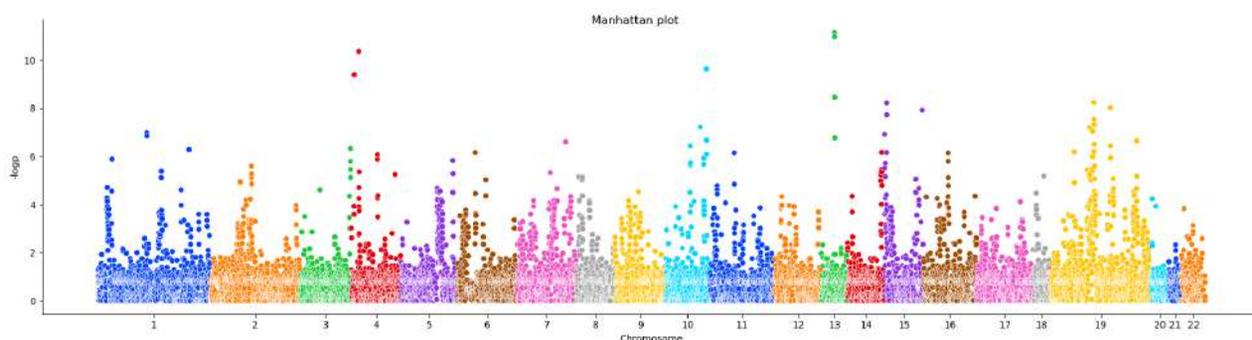


Рис. 3. Результаты полноэкзомного ассоциативного CNV анализа и риска развития нефропатологии. На горизонтальной оси указан номер хромосомы, на вертикальной оси — статистическая значимость протестированных маркеров

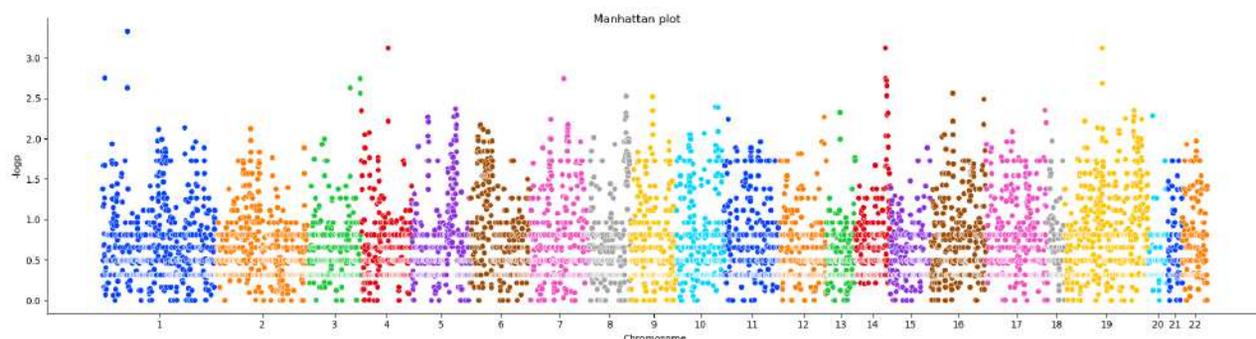
CNV анализ данных NGS пациентов с некоронарогенной патологией сердца выявил 505 локусов, ассоциированных с данным типом заболеваний. После введения поправки на множественные сравнения ни один из них не сохранил достоверного уровня значимости, что, скорее всего, связано с меньшим размером выборки пациентов. На рисунке 4, отражающем распределение степени вероятности ошибки при тестировании гипотезы об отсутствии связи обнаруженных CNV с риском развития некоронарогенной патологии сердца, также можно видеть отличающуюся от предыдущих патологий картину: гораздо более сильный фон и отсутствие значительно

выдающихся локусов. В таблице 5 приведены результаты для данных до внесения поправки. Размер вариативных локусов составил от 104 до 24 350 536 п. н. при среднем значении в  $130\ 166,1 \pm 1\ 092\ 506$  п. н. В таблице 5 представлены 20 CNV, для которых показан наиболее высокий уровень значимости при сравнении с контрольной выборкой.

Для некоронарогенной патологии сердца наиболее значимо ассоциированные локусы, как делеции, так и преобладающие по количеству дубликации, с большей частотой встречались в выборке пациентов. Обратное распределение частот было выявлено для дубликаций в генах *ATAD3A* (AAA до-

мен, содержащий белок 3А семейства АТ-Фаз), *COL8A2* (коллаген VIII типа альфа-2 цепь) и *ANKRD11* (кодирует белок, содержащий домен анкиринового повтора), а также для делеции в гене *AADAC* (ген арилацетамиддеа-

цетилазы). Следует отметить, что среди генов, чаще содержащих дупликации среди контролей, также были гены белков, включающих домен «цинкового пальца».



**Рис. 4.** Результаты полноэкзомного ассоциативного CNV анализа и риска развития некоронарогенных заболеваний сердца. На горизонтальной оси указан номер хромосомы, на вертикальной оси — статистическая значимость протестированных маркеров

**Таблица 5**

Наиболее значимые CNV у пациентов с некоронарогенной патологией сердца

№	Начало	Конец	Размер	Ген	Тип	P-value	Частота у пациентов	Частота у контролей
4	88258356	88537620	279 264	<i>DSPP, SPARCL1, NUDT9, HSD17B11</i>	DUP	0,0008	0	0,286
14	105407975	105412746	4 771	<i>AHNAK2</i>	DUP	0,0008	0	0,254
1	1451381	1454380	2 999	<i>ATAD3A</i>	DUP	0,002	0,194	0,016
3	195505660	195513872	8 212	<i>MUC4</i>	DUP	0,002	0	0,254
7	100348797	100350701	1 904	<i>ZAN</i>	DUP	0,002	0	0,254
19	23414968	23543113	128 145	<i>ZNF91</i>	DUP	0,002	0	0,27
1	36563587	36564209	622	<i>COL8A2</i>	DUP	0,002	0,226	0,032
3	151531940	151545967	14 027	<i>AADAC</i>	DEL	0,002	0,226	0,032
3	195514022	195515522	1 500	<i>MUC4</i>	DUP	0,003	0	0,238
14	105418446	105419346	900	<i>AHNAK2</i>	DUP	0,003	0,161	0,349
9	90582425	90746890	164 465	<i>FAM75C2, CDK20</i>	DUP	0,003	0	0,238
16	89345469	89346967	1 498	<i>ANKRD11</i>	DUP	0,003	0,129	0
10	116734880	116853656	118 776	<i>TRUB1, ATRNL1</i>	DEL	0,004	0	0,159
10	124269561	124340446	70 885	<i>DMBT1, HTRA1</i>	DUP	0,004	0	0,175
5	140794245	140794995	750	<i>PCDHGA10</i>	DUP	0,004	0	0,238

Окончание таблицы 5

№	Начало	Конец	Размер	Ген	Тип	P-value	Частота у пациентов	Частота у контролей
17	78938051	79414598	476 547	BAHCC1, TMEM105, SLC38A10, C17orf56, RPTOR, CHMP6, BAIAP2, AATK, AZI1, C17orf89	DEL	0,004	0	0,238
19	53058881	53208188	149 307	ZNF611, ZNF83, ZNF701, ZNF808	DUP	0,005	0	0,238
19	53046519	53057543	11 024	ZNF808	DUP	0,005	0	0,238
19	53352338	53391442	39 104	ZNF468, ZNF320	DUP	0,005	0	0,238
4	154853	155912	1 059	ZNF718	DEL	0,005	0	0,222

**Заключение**

Таким образом, в рамках исследования с помощью разработанных скриптов был проведен поиск CNV у 269 пациентов из четырех выборок пациентов (некоронарогенные заболевания сердца; невынашивание беременности (дети); эпилепсия; нефропатология) и контрольной группы. Определены CNV локусы, ассоциированные с каждым типом патологии. Выявленные CNV представляют собой потенциальные маркеры для определения предрасположенности к данным типам заболеваний.

Показано, что наличие делеций, затрагивающих гены белков, содержащих домен «цинковых пальцев», а также некоторые другие гены, ассоциировано с повышенным риском развития невынашивания при беременности, в то время как дубликации в данных генах, наоборот, являются протективными в отношении развития данной патологии. Выявлено, что делеции, затрагивающие широкий спектр генов, являются потенциальными маркерами риска развития эпилепсии, в то время как дубликации некоторых генов у пациентов с эпилепсией практически не обнаруживаются. Для некоронарогенной патологии сердца наиболее ассоциированными локусами оказались дубликации, с большей частотой встречающиеся в выборке пациентов.

*Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам лаборатории экологиче-*

*ской генетики и биотехнологии Института генетики и цитологии НАН Беларуси Е. П. Михаленко, О. Ч. Мазур и О. М. Малышевой, а также А. С. Ивановой за предоставленные данные высокопроизводительного секвенирования. Работа выполнена в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2» 2021–2025 гг., подпрограмма 2 «Геномика, эпигеномика, биоинформатика».*

**Список использованных источников**

1. Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches / H. J. Abel, E. J. Duncavage. – Cancer Genetic. – 2013. – Vol. 206. – P. 432–440. Doi: 10.1016/j.cancergen.2013.11.002.
2. Large-scale copy number polymorphism in the human genome / Sebat J. et al. – Science. – 2004. – Vol. 305. – P. 525–528. Doi: 10.1126/science.1098918.
3. Copy number variation and autism: new insights and clinical implications / B. H. Chung, V. Q. Tao, W. W. Tso. – Journal of the Formosan Medical Association. – 2014. – Vol. 113. – P. 400–408. Doi: 10.1016/j.jfma.2013.01.005.
4. Copy number variation distribution in six monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia / C. A. Castellany et al. – Twin Research and Human Genetics. – 2014. – Vol. 17. – P. 108–120. Doi: 10.1017/thg.2014.6.
5. Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy / H. Olson et al. – An-

- nals of Neurology. – 2014. – Vol. 75. – P. 943–958. doi: 10.1002/ana.24178.
6. Whole-genome CNV analysis: advances in computational approaches / M. Pirooznia, F. S. Goes, P. P. Zandi. – *Frontiers in Genetics*. – 2015. – Vol. 13. Doi: 10.3389/fgene.2015.00138.
  7. Computational methods for discovering structural variation with next-generation sequencing / P. Medvedev, M. Stanciu, M. Brudno. – *Nature Methods*. – 2009. – Vol. 6. – P. S13–S20. Doi: 10.1038/nmeth.1374.
  8. PEMer: a computational framework with simulation-based error models for inferring genomic structural variants from massive paired-end sequencing data / J. O. Korbel et al. – *Genome Biology*. – 2009. – Vol. 10. Doi: 10.1186/gb-2009-10-2-r23.
  9. Ulysses: accurate detection of low-frequency structural variations in large insert-size sequencing libraries / A. Gillet-Markowska et al. – *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 31. – P. 801–808. Doi: 10.1093/bioinformatics/btu730.
  10. BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation / K. Chen et al. – *Nature Methods*. – 2009. – Vol. 6. – P. 667–681. Doi: 10.1038/nmeth.1363.
  11. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads / Ye K. et al. – *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25. – P. 2 865–2 871. Doi: 10.1093/bioinformatics/btp394.
  12. Gustaf: detecting and correctly classifying SVs in the NGS twilight zone / Trappe K. et al. – *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30. – P. 3 484–3 490. Doi: 10.1093/bioinformatics/btu431.
  13. An improved approach for accurate and efficient calling of structural variations with low-coverage sequence data / J. Zhang, J. Wang, Y. Wu. – *BMC Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 13. doi: 10.1186/1471-2105-13-S6-S6.
  14. PRISM: pair-read informed splitread mapping for base-pair level detection of insertion, deletion and structural variants / Y. Jiang, Y. Wang, M. Brudno. – *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – P. 2 576–2 583. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts484.
  15. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives/ M. Zhao et al. – *BMC Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 14. Doi: 10.1186/1471-2105-14-S11-S1.
  16. Copy number variation detection in whole-genome sequencing data using the Bayesian information criterion / R. Xi et al. – *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108. – P. E1128–E1136. Doi: 10.1073/pnas.1110574108.
  17. cn.MOPS: mixture of Poissons for discovering copy number variations in next-generation sequencing data with a low false discovery rate / G. Klambauer et al. – *Nucleic Acids Research*. – 2012. – Vol. 40. Doi: 10.1093/nar/gks003.
  18. CNVnator: an approach to discover, genotype, and characterize typical and atypical CNVs from family and population genome sequencing / A. Abyzov et al. – *Genome Research*. – 2011. – Vol. 21. – P. 974–984. Doi: 10.1101/gr.114876.110.
  19. De novo detection of copy number variation by co-assembly / J. F. Nijkamp et al. // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – P. 3 195–3 202. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts601.
  20. GINDEL: accurate genotype calling of insertions and deletions from low coverage population sequence reads / Chu C. et al. – *PLoS ONE*. – Vol. 9. Doi: 10.1371/journal.pone.0113324.
  21. Population-based structural variation discovery with Hydra-Multi / M. R. Lindberg, I. M. Hall, A. R. Quinlan – *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 31 (8). – P. 1286–1289. doi: 10.1093/bioinformatics/btu771.
  22. LUMPY: a probabilistic framework for structural variant discovery / R. M. Layer. – *Genome Biology*. – 2014. – Vol. 15. Doi: 10.1186/gb-2014-15-6-r84.
  23. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing / E. Talevich et al. – *PLOS Computational Biology*. – 2016. – Vol. 12 (4). Doi: 10.1371/journal.pcbi.1004873.
  24. ClinCNV: novel method for allele-specific somatic copy-number alterations detection / G. Demidov, S. Ossowski. – *bioRxiv*. [Electronic resource]. – URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/837971v1.full> (дата обращения 24.12.2021).
  25. FastQC [Electronic resource]: The Babraham Bioinformatics group. – URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/index.html> (дата обращения 24.12.2021).
  26. Trimmomatic: A flexible read trimming tool for Illumina NGS data: RWTH Aachen Univer-

sity [Electronic resource]. – URL: <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic> (дата обращения 24.12.2021).

27. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools / H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker. – Bioinformatics. – 2009. – Vol. 25(16). – P. 2078–2079. Doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.

28. bedtools: a powerful toolset for genome arithmetic [Electronic resource]. – URL: <https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/> (дата обращения 24.12.2021).

29. Genotype Analysis Toolkit: Broad Institute [Electronic resource]. – URL: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us> (дата обращения 24.12.2021).

30. CNVRanger: Summarization and expression/phenotype association of CNV ranges: Bioconductor [Electronic resource]. – URL: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CNVRanger.html> (дата обращения 24.12.2021).

31. Numpy: The fundamental package for scientific computing with Python [Electronic resource]. – URL: <https://numpy.org/> (дата обращения 24.12.2021).

32. Seaborn: statistical data visualization [Electronic resource]. – URL: <https://seaborn.pydata.org/index.html> (дата обращения 24.12.2021).

33. Pandas [Electronic resource]. – URL: <https://pandas.pydata.org/> (дата обращения 24.12.2021).

A. D. Liaudanski<sup>1</sup>, R. S. Shulinski, Y. A. Mishuk<sup>1</sup>

## POSSIBLE APPLICATIONS OF CNV ANALYSIS TO SEARCH FOR POTENTIAL MARKERS TO A HEREDITARY DISEASE PREDISPOSITION

State Scientific Institution  
“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”  
27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus  
e-mail: o.liaudanski@igc.by

A CNV analysis of high-throughput sequencing data on 269 patients from four patient cohorts (noncoronary heart disease; preterm infants; epilepsy; and nephropathology) and the control was performed as part of the study. Multiple CNVs associated with each type of pathology were identified. The identified CNVs may be regarded as potential markers in determining a predisposition to these types of diseases (disease susceptibility markers).

**Keywords:** CNV analysis, bioinformatic analysis of high throughput sequencing data, disease susceptibility markers.

*Дата поступления в редакцию: 06 февраля 2023 г.*

К. Ю. Песоцкая<sup>1</sup>, А. Л. Лагоненко<sup>2</sup>, А. Н. Евтушенков<sup>1</sup>

## ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ГЕНА *OHRR* НА ПРОДУКЦИЮ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ ФИТОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ *ERWINIA AMYLOVORA*

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет  
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр-т Независимости, 4  
<sup>2</sup>ООО «Альгимед Техно»  
Республика Беларусь, 220090, г. Минск, Логойский тракт, 22/1  
e-mail: lagonenkoal@mail.ru

Белки семейства MarR (*Multiple Antibiotic Resistance*) составляют группу транскрипционных регуляторов, изменяющих экспрессию генов, отвечающих за вирулентность, стрессовые реакции, формирование биопленок и выведение из бактериальных клеток широкого спектра токсичных веществ: антибиотиков, фенольных соединений, активных форм кислорода. В данном исследовании был сконструирован делеционный мутант *Erwinia amylovora* по гену транскрипционного регулятора OhrR и осуществлены его фенотипическая и фитопатологическая характеристики. Бактерии *E. amylovora*  $\Delta$ ohrR обладали сниженной вирулентностью по отношению к вегетирующим растениям груши, сниженной продукцией экзополисахарида левана и сниженной выживаемостью при обработке клеток перекисью водорода. Кроме того, клетки мутанта синтезировали большее количество экзополисахарида амиловорана по сравнению с клетками бактерий дикого типа. В совокупности полученные результаты идентифицируют OhrR как новый регулятор вирулентности *Erwinia amylovora*.

**Ключевые слова:** *Erwinia amylovora*, транскрипционный регулятор OhrR, факторы вирулентности, экзополисахариды, окислительный стресс, перекись водорода.

### Введение

В естественной среде обитания растения подвергаются воздействию стрессоров биотической (фитопатогенные инфекции и др.) и абиотической (засуха, засоление почвы, экстремальные температуры) природы. Устойчивость растений к воздействию патогена обуславливается интенсификацией процессов генерации активных форм кислорода (АФК). Обычно в клетках растений АФК образуются в качестве побочных продуктов реакций в процессе метаболизма (например, при фотосинтезе) [1]. При инфицировании патогеном устойчивых к нему растений наблюдается резкое увеличение образования АФК, а также оксида азота и салициловой кислоты, что приводит к развитию реакции сверхчувствительности. В некоторых случаях образование АФК в растительных клетках необходимо для успешного установления и развития заболевания (например, бактериального ожога плодовых культур, вызываемого бактерией *Erwinia amylovora*) [2].

Способность поддерживать внутриклеточные концентрации токсичных АФК на оптимальном уровне необходима для всех аэробных форм жизни. У бактерий, как и у других организмов, АФК продуцируются в ходе процесса аэробного метаболизма, что требует наличия мощной антиоксидантной системы, обезвреживающей как собственные, так и внешние АФК. Клетки бактерий могут подвергаться кратковременному воздействию высоких концентраций АФК, что обусловлено защитным ответом растений при их инфицировании патогенным микроорганизмом. Именно поэтому в бактериальных клетках функционируют белки-регуляторы транскрипции, способные детектировать АФК в окружающей среде и запускать ответную реакцию на окислительный стресс. Одними из наиболее изученных среди таких регуляторов являются белок OhrR, относящийся к семейству транскрипционных регуляторов MarR; белок OxyR, принадлежащий к семейству транскрипционных регуляторов LysR; белок PerR, принадлежащий к семей-

ству транскрипционных факторов Fur. Домены белков OxyR и PerR способны к селективному распознаванию малых количеств  $H_2O_2$ , в то время как домены регулятора *OhrR* распознают наличие органических гидропероксидов (ROOH) и гипохлорита натрия (NaOCl) путем обратимого окисления определенных остатков цистеина. Наряду с этим, данные транскрипционные регуляторы принимают участие в преодолении патогеном иммунитета растений-хозяев, а также в процессах формирования биопленок и механизмах резистентности клеток к различным антибиотикам [3]. Роль транскрипционного регулятора *OhrR* в той или иной степени была выяснена у *Dickeya zeeae*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* [4, 5, 6, 7, 8].

Целью данного исследования явилась физиолого-биохимическая, молекулярно-биологическая, а также фитопатологическая характеристика штамма *Erwinia amylovora*, мутантного по гену транскрипционного регулятора *OhrR*.

### Материалы и методы

Использованные в исследовании штаммы бактерий, плазмиды и праймеры приведены в таблицах 1 и 2. Бактерии выращивались при 28 °C в полноценной питательной среде LB и синтетической минимальной среде M9 с добавлением глицерина (2 мл/л) в качестве источника углерода. Состав среды LB (г/л): пептон — 10; дрожжевой экстракт — 5; NaCl — 8,5. Состав среды M9 (г/л):  $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$  — 12,8;  $KH_2PO_4$  — 3;  $NH_4Cl$  — 1,0; NaCl — 0,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  — 0,246;  $CaCl_2$  — 0,011 [9].

Таблица 1

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник или ссылка
Штаммы <i>Erwinia amylovora</i>		
<i>E. amylovora</i> E2	Штамм дикого типа, выделен из <i>Malus</i> sp. в Беларуси в 2007 г.	Коллекция кафедры молекулярной биологии
<i>E. amylovora</i> $\Delta$ <i>ohrR</i>	$\Delta$ <i>ohrR</i> мутант, Km <sup>R</sup>	Это исследование
Плазмиды		
pKD46	Ap <sup>R</sup> , P <sub>BAD</sub> gam bet exo pSC101 oriTS	[10]
pKD13	Km <sup>R</sup> , FRT cat FRT PS1 PS2 oriR6K rgbN	[10]

**Примечание.** Km<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup> — устойчивость к канамицину и ампициллину соответственно

Таблица 2

Использованные в работе праймеры

Название праймера	Последовательность (5'-3')	Назначение/ссылка
OhrRF	TTAACCATTAAAGGTTATCACGTAGCATTTCAAGCTC-GCTTTTCAGCGATTGCGATTGTGTAGGCTGGAGCT	Внесение делеции в ген <i>ohrR</i>
OhrRR	ATAGTGCACTATCTATCATCTTAGCATGATGACC-GATAAAAACGATAAGAATTCCGGGGATCCGTCGACC	Внесение делеции в ген <i>ohrR</i>
OhrPRF	CCGCTCGAGTCCGGCTTCAGCATGAGCTTTTCTG	Детекция делеции гена <i>ohrR</i>
Km1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Детекция делеции гена <i>ohrR</i> [10]

Поиск генов, кодирующих транскрипционные регуляторы MarR-семейства в геноме *E. amylovora* E2 (код доступа в GenBank NZ\_CP024970.1) осуществлялся с использованием программы SigmID [11]. Поиск гомологичных последовательностей в базах данных осуществлялся с помощью пакета программ BLAST [12].

Для получения делеционного мутанта *E. amylovora* по гену *ohrR* была использована техника «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes» (Datsenko and Wanner, 2000).

Для искусственного заражения бактериями *Erwinia amylovora* использовались однолетние растения груши, выращенные *ex vivo* на базе отдела биотехнологии РУП «Институт плодородства НАН Беларуси». У каждого растения самый молодой лист разрезался поперек (затрагивая центральную жилку) ножницами, предварительно погруженными в суспензию клеток *E. amylovora* ( $OD_{600} = 0,1$ ) [13]. Инокулированные растения инкубировались при 25 °С, относительной влажности 70%, 16-и часовом световом фотопериоде. Учет результатов проводился на 6-ые, 9-ые и 12-ые сутки с момента заражения. Интенсивность развития заболевания выражалась в процентном отношении пораженной некротом части побега от его общей длины.

Уровень синтеза экзополисахарида амиловорана определялся путем измерения мутности опытного раствора при взаимодействии хлорид-ионов цетилпиридиума (CPC) с карбоксильной группой глюкуроновых кислот в структуре амиловорана, что вызывает преципитацию молекул экзополисахарида. Для этого суспензия бактериальных клеток осаждалась центрифугированием при 10 000 g, после чего к супенатанту добавлялся раствор хлорид цетилпиридиниума в концентрации 50 мг/мл. Оптическая плотность раствора измерялась при длине волны 600 нм. Полученные значения пересчитывались на значения оптической плотности бактериальной культуры для каждой пробы соответственно [13].

Продукция экзополисахарида левана клетками *E. amylovora* оценивалась по активности фермента левансукказы, отвечающего за синтез полисахарида. После осаждения бактериальных клеток к надосадочной жидкости добавлялся LS-буфер (50 мМ К-фосфатный

буфер, рН 7,0; 2М сахараза; 0,05%  $NaN_3$ ) в соотношении 1 : 1. После инкубации проб при 28 °С в течение 24 ч измерялась оптическая плотность раствора при 600 нм. Полученные значения пересчитывались на значения оптической плотности бактериальной культуры для каждой пробы соответственно [14].

Изучение продукции целлюлозы клетками дикого типа и мутантных штаммов *E. amylovora* осуществлялось с использованием красителей Конго красный и Кумасси бриллиантовый синий G-250. Ночные культуры исследуемых штаммов наносились на поверхность агаризованной среды (1,5%-ный LB-агар без добавления NaCl), содержащей красители в соответствующей концентрации. Учет результатов проводился визуально после инкубации в течение 24 ч при 28 °С [15].

Количественная оценка интенсивности формирования биопленок проводилась методом, описанным в работе [15], с некоторыми модификациями. Ночная культура *E. amylovora* разводилась средой инкубации (полноценной средой LB) до оптической плотности 0,05. Полученные суспензии вносились в лунки стерильного 96-луночного планшета и инкубировались при 28 °С в течение 48 и 72 ч. Для окрашивания клеток биопленки использовался 1%-ный раствор красителя генцианового фиолетового. Для экстракции связавшегося красителя лунки планшета заполнялись 96% этанолом, после чего измерялась оптическая плотность при длине волны 595 нм. Полученные значения пересчитывались на значения оптической плотности культуры для каждой из лунок соответственно.

Подвижность клеток *E. amylovora* изучалась с использованием полноценной полужидкой агаризованной среды LB. Суспензия бактериальных клеток в объеме 10 мкл наносилась на поверхность необходимой агаризованной среды. Диаметр макроколонии бактерий учитывался через 24, 48 и 72 ч инкубации при 28 °С [16].

Влияние перекиси водорода на выживаемость клеток исследуемых штаммов *E. amylovora* оценивалось по количеству колоний микроорганизмов, выросших после обработки клеток перекисью водорода в соответствующей концентрации, по сравнению с контролем (без обработки  $H_2O_2$ ). Количество коло-

ниеобразующих единиц определяли методом серийных разведений после 48 ч роста на агаризованной полноценной среде при 28 °С [17].

Определение чувствительности штаммов *E. amylovora* к различным концентрациям  $\text{CdCl}_2$  проводилось диско-диффузионным методом. Для этого 300 мкл суспензии бактериальных клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста ( $\text{OD}_{600} \approx 0,3\text{--}0,4$ ), вносили в пробирки, содержащие 3 мл расплавленного и охлажденного до 50 °С 0,7% LB-агара. Затем содержимое пробирок равномерно распределялось по поверхности чашки Петри, содержащей 1,5% LB-агар. После высушивания при комнатной температуре в течение 15 мин на поверхность 0,7% агара помещались бумажные диски, пропитанные растворами различной концентрации  $\text{CdCl}_2$  (10 мкМ – 0,5 М). Зону ингибирования, образовавшуюся после инкубации в течение 24 ч при 28 °С, измеряли в миллиметрах [17, 18].

Исследования влияния ионов кадмия на устойчивость клеток *E. amylovora* к перекиси водорода проводилось по методике, описанной в работе [18] с некоторыми модификациями. К суспензиям клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста, вносился раствор  $\text{CdCl}_2$  в концентрации 75 мкМ, после чего клетки инкубировались при 28 °С 2 ч. Затем к клеткам *E. amylovora* добавлялся раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  в соответствующей концентрации. Выживаемость клеток исследуемых штаммов оценивалось по количеству колоний микроорганизмов, выросших после обработки клеток перекисью водорода, по сравнению с контролем (без обработки  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Принцип количественного определения активности каталазы основан на захвате неионогенным ПАВ Triton X-100 (ТХ) образующихся в процессе разложения перекиси водорода молекул молекулярного кислорода, выделяющихся в виде пузырьков, которые визуализируются ТХ в виде пены. В каждую пробирку вносился 30% раствор перекиси водорода, 1% раствор ТХ и суспензия клеток *E. amylovora*, предварительно ресуспендированных в 0,5× Na-фосфатном буфере (рН 7,4) в соотношении 1 : 1 : 1. Высота пены, образованной в пробирках, измерялась в миллиметрах. Активность каталазы рассчитывалась с помощью калибровочного графика с использованием коммерче-

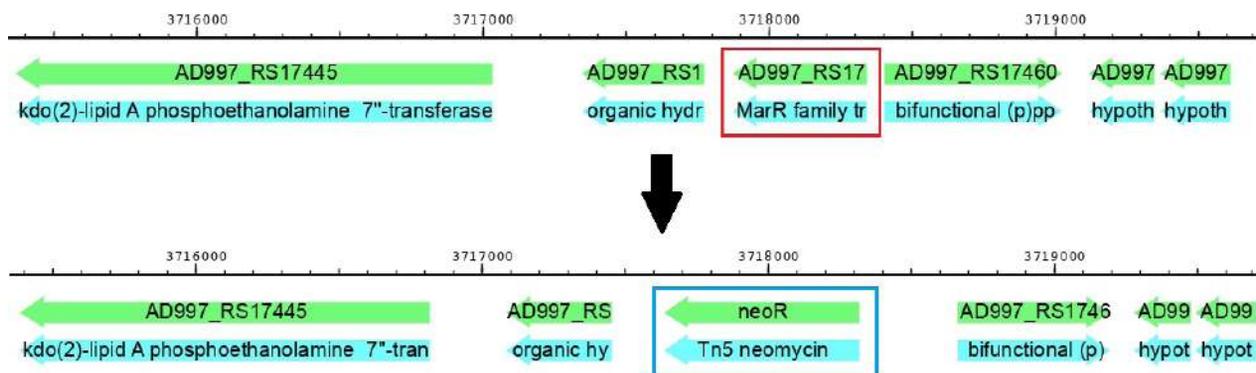
ской каталазы (Sigma-Aldrich) и выражалась в единицах активности (U) (единица каталазной активности соответствует деструкции 1 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  в минуту при 25 °С, рН 7,0) [19].

Статистическая обработка результатов проводилась в программе GraphPad Prism 8. Для проверки отклонения распределения от нормального применяли обладающий наибольшей мощностью тест Шапиро-Уилка. При выявлении нормального распределения для оценки достоверности различий был применен t-критерий Стьюдента для независимых выборок в модификации Уэлча (сравнение средних без какого-либо предположения о равенстве дисперсий). При выявлении распределения, отличного от нормального, для оценки достоверности различий был применен U-критерий Манна-Уитни. Различия считались значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Как известно, транскрипционные регуляторы, принадлежащие к MarR-семейству (Multiple Antibiotic Resistance Regulator), широко распространены у бактерий и архей. Предыдущие исследования показали, что представители семейства регулируют вирулентность многих патогенных бактерий животных и растений (например, SlyA *Salmonella enterica* и Dickeya zeeae, MarR и MexR *Escherichia coli*, PecS *Dickeya dadantii*, SarZ и MerP *Staphylococcus aureus*, MarR *Streptococcus pneumoniae* и др.) [20, 21, 22]. Геном *Erwinia amylovora* кодирует несколько транскрипционных факторов семейства MarR.

Обзор литературных данных, а также биоинформационный анализ генома *Erwinia amylovora* E2 позволил выявить четыре гена, кодирующие регуляторы MarR-семейства: *marR* (координаты в геноме 1,533,551..1,533,982 п. н.), *mprA* (2,834,616..2,835,146 п. н.), *slyA* (1,802,653..1,803,090 п. н.) и *ohrR*. Ген *ohrR* кодирует белок, состоящий из 155 а. о., массой 17,6 кДа. В геноме возбудителя бактериального ожога этот ген локализован на участке хромосомы с 3 717 873 по 3 718 340 п. н. (рис. 1). Как правило, OhrR представляет собой белок-репрессор транскрипции. В нормальных условиях он подавляет экспрессию гена *ohr*, кодирующего тиоловую пероксидазу — фермент, катализирующий реакцию вос-



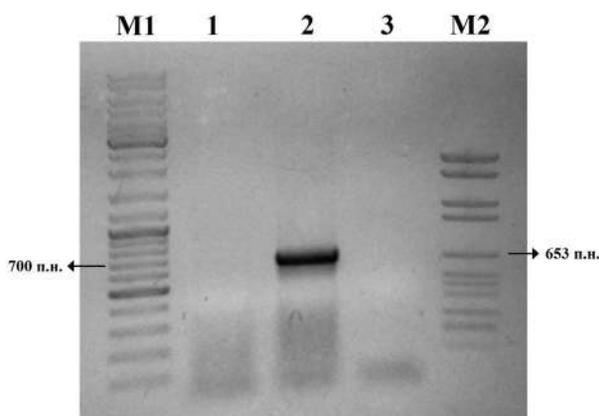
**Рис. 1.** Структура участка хромосомы *E. amylovora* E2, содержащего ген *ohrR* (выделен красным цветом). В результате мутагенеза с использованием метода «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes» ген *ohrR* был замещен на ген устойчивости к канамицину *neoR* (выделен голубым цветом)

становления органических гидропероксидов до менее токсичных для клетки спиртов. При попадании в бактериальные клетки токсичных веществ (ROOH или NaOCl) происходит инактивация *OhrR* посредством окисления консервативных для MarR-семейства остатков цистеина в N-концевом домене белка, что препятствует связыванию *OhrR* с ДНК и приводит к депрессии генов-мишеней [3, 5]. Описанный механизм работы свойственен большинству видов бактерий, для которых было выявлено наличие белка *OhrR* (за исключением *Streptomyces coelicolor*) [3], однако у фитопатогенной бактерии *Erwinia amylovora* роль данного регулятора по-прежнему остается неясной.

Для инактивации гена *ohrR* были сконструированы праймеры *OhrRF* и *OhrRR* для ам-

плификации гена устойчивости к канамицину в составе плазмиды pKD13, несущие на 5'-конце последовательности (50 н.) соответствующие началу или концу делетируемой области генома *Erwinia amylovora* (табл. 2). Полученные с помощью таких праймеров ПЦР-продукты были трансформированы в клетки *Erwinia amylovora* E2, несущие хелперную плазмиду pKD46 и выращенные в условиях индукции рекомбиназы. В результате проделанной работы был отобран штамм устойчивый к канамицину. Наличие делеции гена *ohrR* было подтверждено ПЦР с праймером *OhrPRF* к области, фланкирующей делецию, а также с внутренним праймером к гену устойчивости к канамицину Km1 (табл. 2, рис. 2).

Как видно из приведенных данных, в реакции был получен ПЦР-продукт размером око-



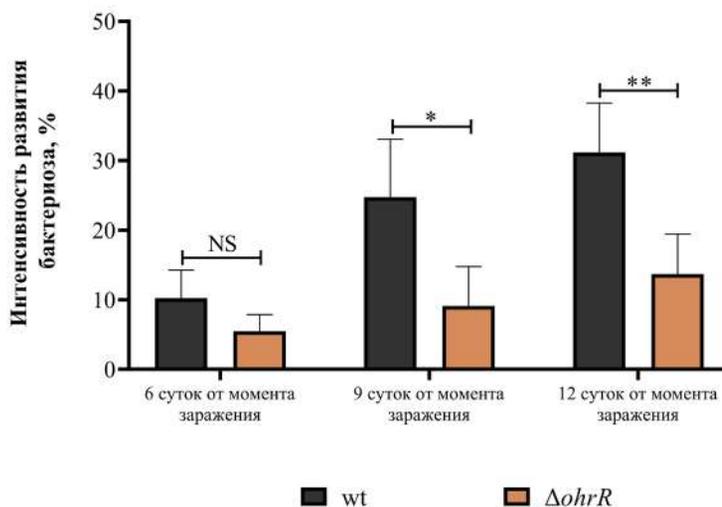
**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации с использованием праймеров *OhrPRF* и *Km1* M1 — маркер молекулярного веса GeneRuler DNA Ladder Mix (100–10 000 п. о., Thermo Scientific), M2 — маркер молекулярного веса DNA Molecular Weight Marker VI (154–2 176 п. о., Roche), 1 — ДНК штамма *E. amylovora* E2 дикого типа, 2 — ДНК штамма *E. amylovora*  $\Delta$ *ohrR*, 3 — контроль без матрицы

ло 650 п. н., что соответствует ожидаемому.

На следующем этапе работы мы исследовали роль белка *OhrR* в вирулентности клеток *E. amylovora*. Как видно из рисунка 3, при заражении растений груши мутантным штаммом *E. amylovora*  $\Delta ohrR$  развитие симптомов бактериального ожога было значительно замедле-

но к девятым и двенадцатым суткам. Сходные данные были получены в работе [4]. Делеция гена *ohrR* у *Dickeya zeae* привела к снижению вирулентности клеток при искусственном заражении ими семян риса, клубней картофеля и корней редьки.

Как известно, биопленки представляют

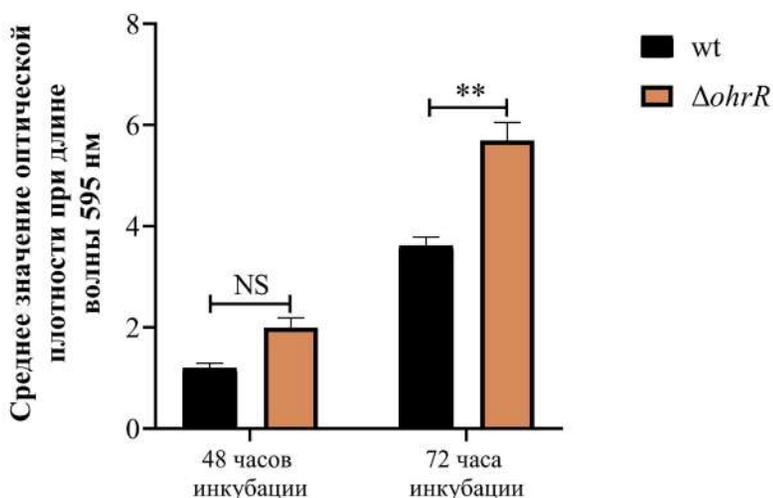


**Рис. 3.** Интенсивность развития бактериального ожога на молодых растениях груши (*Pirus* sp.) при заражении клетками *E. amylovora* E2 (wt) и *E. amylovora*  $\Delta ohrR$ . (U-критерий Манна-Уитни). NS — нет достоверных различий ( $P > 0,05$ ); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$

собой сообщества разного рода микроорганизмов, клетки которых прикреплены к различной биотической и абиотической поверхности и погружены в биополимерный матрикс [23]. Процесс их образования традиционно включает в себя несколько стадий: начальное и обратимое прикрепление клеток к субстрату (адгезия); необратимое прикрепление клеток к субстрату; созревание и рост зрелой биопленки и формирование ее трехмерной структуры; дисперсия одиночных планктонных клеток, способных образовать новую колонию. Адгезия считается ключевым этапом в процессе образования биопленки. Однако первичный контакт с субстратом не предполагает окончательного закрепления на нем микроорганизмов и опосредуется, как правило, обратимыми электростатическими, гидрофобными и Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями между клетками и поверхностью [23, 24]. Исходя из этих данных, нами была изучена способность клеток мутантного штамма образовывать биопленки. Как видно из рисунка 4, на полноценной среде LB при инкубации кле-

ток исследуемого штамма *E. amylovora*  $\Delta ohrR$  в течение 72 ч способность формировать биопленки была значительно выше, чем у клеток штамма дикого типа.

В формировании биопленок одну из ведущих ролей играют экзополисахариды, липополисахариды, а также поверхностные структуры бактериальных клеток: жгутики, фибрии, пили, обеспечивающие подвижность, необходимую для биопленкообразования. Они отвечают за необратимое прикрепление бактериальных клеток к различным субстратам [24]. Экзополисахариды, в свою очередь, обеспечивают стабилизацию трехмерной структуры уже зрелой биопленки, а также защищают бактериальные клетки от осмотического стресса, изменений pH окружающей среды и воздействия УФ-излучения [25]. Клетки *E. amylovora* продуцируют несколько экзополисахаридов: амиловоран, леван и целлюлозу. Эксперименты по оценке количества амиловорана показали, что уровень продукции этого экзополисахарида клетками *E. amylovora*  $\Delta ohrR$  повышен в два раза по сравнению с E2. Так-

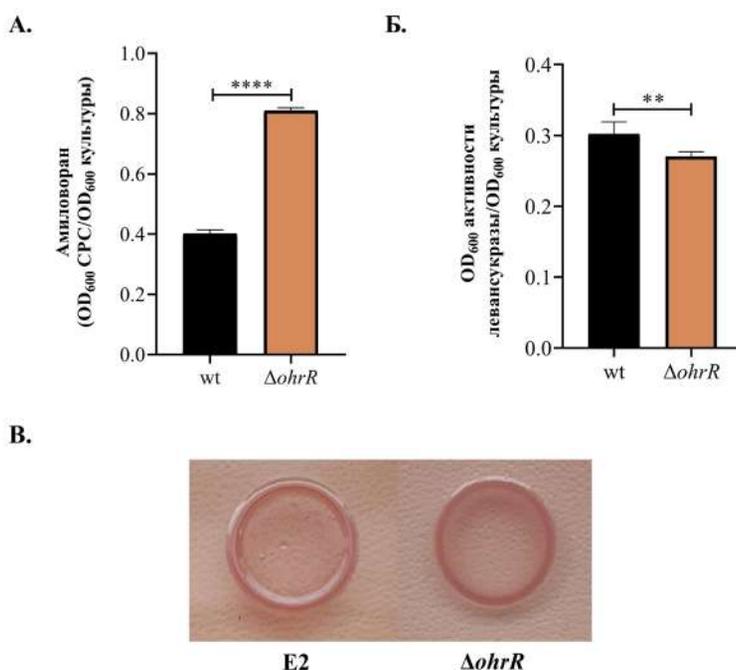


**Рис. 4.** Интенсивность формирования биопленок клетками  $\Delta ohrR$  и штамма дикого типа (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). NS — нет достоверных различий ( $P > 0,05$ ); \*\* $P < 0,01$

же у мутантного штамма нами было выявлено некоторое снижение синтеза левана. Количество целлюлозы, продуцируемое клетками *E. amylovora*  $\Delta ohrR$ , не отличалось от такового у клеток *E. amylovora* E2 (рис. 5А–В). Полученные результаты указывают на роль белка *OhrR* в качестве положительного (в случае с леваном) и негативного регулятора (в случае с амиловораном) в процессах выработки двух важнейших для *E. amylovora* экзополисахаридов.

На сегодняшний день известно, что белок *OhrR* принимает участие в регуляции продукции факторов вирулентности у другого фитопатогенного микроорганизма — *Dickeya zeae* — возбудителя гнили риса, картофеля. Делеция данного транскрипционного регулятора уменьшает выработку клетками фитотоксина зеамин, продукцию внеклеточной целлюлазы [4].

В работе [4] также была упомянута роль

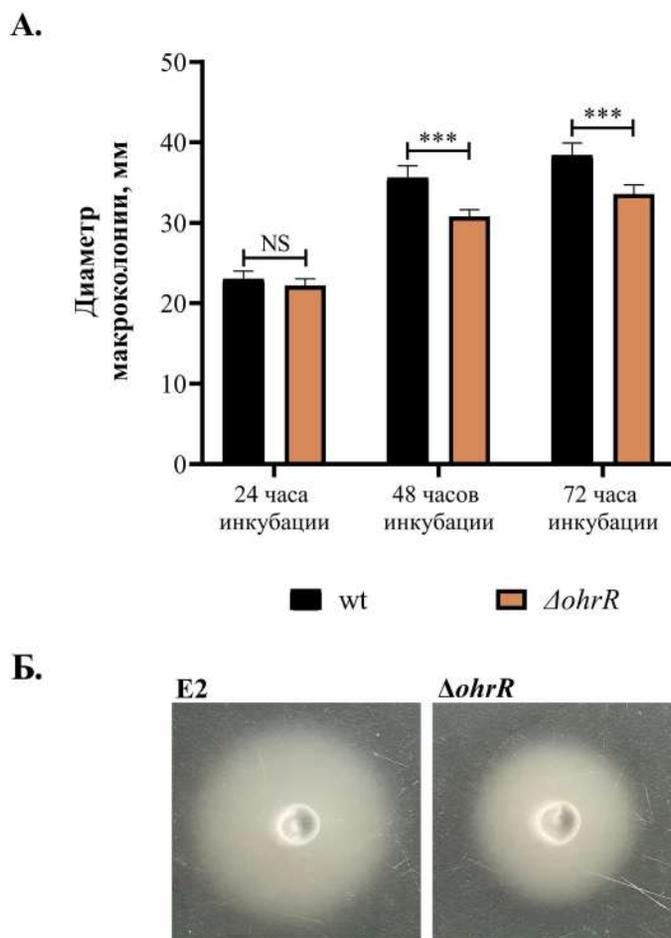


**Рис. 5.** Продукция экзополисахаридов клетками штаммов *E. amylovora* E2 (wt) и  $\Delta ohrR$ . (А) Продукция амиловорана (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). (Б) Активность левансуказы (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,001$ . (В) Качественное определение продукции целлюлозы

*OhrR* как негативного регулятора подвижности клеток *D. zeae*. Как видно из рисунка 6, клетки *E. amylovora*  $\Delta ohrR$  на полноценной среде культивирования образовывали макроколонии

меньшего диаметра по сравнению со значениями, полученными для E2.

Хорошо известно, что различные виды микроорганизмов имеют разную чувстви-

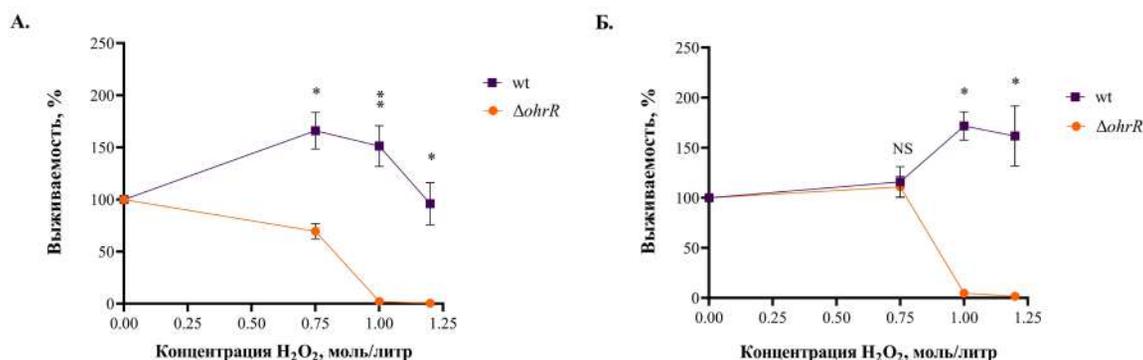


**Рис. 6.** Подвижность клеток бактерий *Erwinia amylovora* E2 (wt) и *Erwinia amylovora*  $\Delta ohrR$  (А) (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). NS — нет достоверных различий ( $P > 0,05$ ); \*\*\* $P < 0,001$ . (Б) Фотография бактериальных макроколоний спустя 48 ч инкубации при 28 °С на полноценной среде LB

тельность к тем или иным окислителям. Для исследования влияния перекиси водорода на выживаемость штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora*  $\Delta ohrR$  мы использовали концентрации  $H_2O_2$  0,75 моль/л, 1 моль/л и 1,2 моль/л. Как видно из рисунка 7А, с увеличением концентрации перекиси водорода количество жизнеспособных клеток штамма *E. amylovora*  $\Delta ohrR$  уменьшалось. Так, при действии 0,75 М  $H_2O_2$  чувствительность клеток мутантного штамма снизилась в 2 раза по сравнению с контролем. Инкубация клеток с 1 М и 1,2 М  $H_2O_2$  привела к полному прекращению роста клеток

делеционного мутанта, в то время как выживаемость штамма *E. amylovora* E2 оставалась на прежнем уровне. Это может свидетельствовать о том, что регулятор *OhrR* принимает непосредственное участие в резистентности клеток *E. amylovora* к повреждающим воздействиям перекиси водорода.

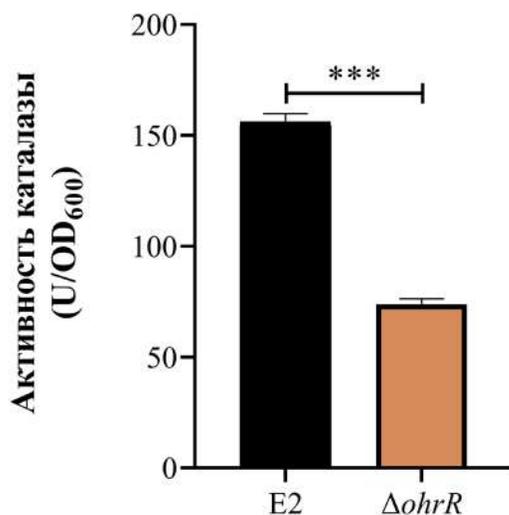
Следует отметить, что присутствие в среде культивирования хлорида кадмия ( $CdCl_2$ ) в концентрации 75 мкМ повышало выживаемость как клеток штамма *E. amylovora*  $\Delta ohrR$ , так и *E. amylovora* E2 (рис. 7Б). Так, выживаемость штамма, дефектного по гену



**Рис. 7.** Эффект ионов кадмия ( $Cd^{2+}$ ) на выживаемость клеток *Erwinia amylovora* в присутствии окислителя. (А) Выживаемость клеток *Erwinia amylovora* E2 (wt) и *Erwinia amylovora*  $\Delta oh r R$  при их обработке только перекисью водорода в течение 180 мин (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). (Б) Выживаемость клеток *Erwinia amylovora* E2 (wt) и *Erwinia amylovora*  $\Delta oh r R$  при их обработке перекисью водорода в течение 180 мин и предварительной обработке хлоридом кадмия в течение 180 мин (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). NS — нет достоверных различий ( $P > 0,05$ ); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$

*ohrR*, практически не отличалась от таковой для штамма E2 в присутствии 0,75 М  $H_2O_2$ . Достоверное отличие между выживаемостью исследуемых штаммов отмечалось при концентрации перекиси водорода 1 М и 1,2 М как при наличии в среде ионов кадмия ( $Cd^{2+}$ ), так и в их отсутствие. Сходные результаты были получены для клеток *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Присутствие в среде культивирования хлорида кадмия в концентрации 75 мкМ повышало выживаемость клеток фитопатогена при последующей их обработке перекисью водорода, третбутилгидропероксидом (tBOOH) и менадином [18].

В связи с последними полученными результатами представляло интерес изучить каталазную активность мутантного штамма *E. amylovora*, так как каталаза является одним из ключевых ферментов антиоксидантной защиты. В результате для штамма *E. amylovora*  $\Delta oh r R$  была установлена более низкая каталазная активность ( $73,76 \pm 2,5$  U) по сравнению со штаммом дикого типа *E. amylovora* E2 ( $156 \pm 3,9$  U) (рис. 8). Данные относительно поведения мутанта *E. amylovora*  $\Delta oh r R$  согласуются с описанной функцией белка *OhrR* в регуляции работы системы антиоксидантной защиты бактериальных клеток.



**Рис. 8.** Активность каталазы (U) штаммов *Erwinia amylovora* E2 и *Erwinia amylovora*  $\Delta oh r R$  (t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). \*\*\* $P < 0,001$

### Заключение

В настоящем исследовании мы сконструировали делеционный мутант *E. amylovora* по гену транскрипционного регулятора *OhrR* и изучили его фенотип. Согласно нашим результатам, *OhrR* прямо или косвенно контролирует продукцию экзополисахаридов амиловорана и левана. Нарушение синтеза экзополисахаридов клетками *ΔohrR*, а также высокая чувствительность клеток к перекиси водорода может быть причиной снижения их вирулентности по отношению к растениям груши. В совокупности наши результаты идентифицируют *OhrR* как регулятор вирулентности *Erwinia amylovora* и представляют новое понимание работы сложных генных регуляторных сетей, которые контролируют физиологию и уровень вирулентности *E. amylovora*.

### Список использованных источников

1. Das, K. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants / K. Das, A. Roychoudhury. – *Frontiers in Environmental Science*. – 2014. – Vol. 2, № 53. – P. 1–13.
2. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art / K. Vrancken [et. al.]. – *Microbiology*. – 2013. – Vol. 159, № 5. – P. 823–832.
3. Dubbs, J. M. Peroxide Sensing Transcriptional Regulators in Bacteria / J. M. Dubbs, S. Mongkolsuk. – *Journal of Bacteriology*. – 2012. – Vol. 194, № 20. – P. 5 495–5 503.
4. *OhrR* is a central transcriptional regulator of virulence in *Dickeya zea* / M. Lv [et. al.]. – *Microbiology*. – 2022. – Vol. 23, № 1. – P. 45–59.
5. Structural Mechanism of Organic Hydroperoxide Induction of the Transcription Regulator *OhrR* / K. J. Newberry [et. al.]. – *Molecular Cell*. – 2007. – Vol. 28, № 4. – P. 652–664.
6. The global transcriptional response to organic hydroperoxide and the role of *OhrR* in the control of virulence traits in *Chromobacterium violaceum* / M. Previato-Mello [et. al.]. – *Infection and Immunity*. – 2017. – Vol. 85, № 5. – P. 1–18.
7. Analyses of the Regulatory Mechanism and Physiological Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *OhrR*, a Transcription Regulator and a Sensor of Organic Hydroperoxides / S. Atichartpongkul [et. al.]. – *Journal of Bacteriology*. – 2010. – Vol. 192, № 8. – P. 2 093–2 101.
8. *OhrR* and *ohr* are the primary sensor/regulator and protective genes against organic hydroperoxide stress in *Agrobacterium tumefaciens* / W. Panmanee [et al.]. – *Journal of bacteriology*. – 2006. – Vol. 188, № 4. – P. 1 389–1 395.
9. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* : in 3 vol. / ed.: J. Sambrook, D. W. Russel. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – Vol. 3. – 1 875 p.
10. Datsenko, K. A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K. A. Datsenko, B. L. Wanner. – *PNAS*. – 2000. – Vol. 97, № 12. – P. 6 640–6 645.
11. Nikolaichik, Y. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals / Y. Nikolaichik, A. U. Damienikan. – *PeerJ*. – 2016. – e2056. doi:10.7717/peerj.2056.
12. NCBI BLAST: a better web interface / M Johnson [et al.]. – *Nucleic Acids Research*. – 2008. – Vol. 36, № 2, 1. – P. W5–W9. doi:10.1093/nar/gkn201.
13. AmyR Is a Novel Negative Regulator of Amyovorin Production in *Erwinia amylovora* / D. Wang [et al.]. – *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. 1–11.
14. Geier, G. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fire-blight pathogen *Erwinia amylovora* / G. Geier, K. Geier. – *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 1993. – Vol. 42, № 6. – P. 387–404.
15. Castiblanco, L. F. Cellulose production, activated by cyclic di-GMP through BcsA and BcsZ, is a virulence factor and an essential determinant of the three-dimensional architecture of biofilms formed by *Erwinia amylovora* Ea1189 / L. F. Castiblanco, G. W. Sundin. – *Molecular Plant Pathology*. – 2018. – Vol. 19, № 1. – P. 90–103.
16. Lee, J. H. Integration Host Factor Is Required for RpoN-Dependent hrpL Gene Expression and Controls Motility by Positively Regulating rsmB sRNA in *Erwinia amylovora* / J. H. Lee, Y. Zhao. – *Phytopathology*. – 2016. – Vol. 106, № 1. – P. 29–36.
17. Лысак, В. В. Микробиология. Практикум : пособие / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. – Минск : БГУ, 2015. – 115 с.
18. Banjerdkij, P. Exposure to Cadmium Elevates Expression of Genes in the OxyR and *OhrR* Regulons and Induces Cross-Resistance to Perox-

- ide Killing Treatment in *Xanthomonas campestris* / P. Banjerdkij, P. Vattanaviboon, S. Mongkolsuk. – Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71, № 4. – P. 1 843–1 849.
19. Chromosomally Encoded *hok-sok* Toxin-Antitoxin System in the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora*: Identification and Functional Characterization / J. Peng, [et. al]. – Applied and Environmental Microbiology. – 2019. – Vol. 85, № 15. – P. 1–16.
20. SlyA regulates phytotoxin production and virulence in *Dickeya zeae* EC1 / J. N. Zhou [et al.]. – Molecular Plant Pathology. – 2016. – Vol. 17, № 9. – P. 1 398–1 408.
21. MarR Family Transcription Factors from Burkholderia Species: Hidden Clues to Control of Virulence-Associated Genes / A. Gupta [et al.]. – Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2018. – Vol. 83, № 1. – P. 1–19.
22. Deochand, D. K. MarR family transcription factors: dynamic variations on a common scaffold / D. K. Deochand, A. Grove. – Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. – 2017. – Vol. 52, № 6. – P. 595–613.
23. Castiblanco, L. F. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria / L. F. Castiblanco, G. W. Sundin. – Journal of Integrative Plant Biology. – 2016. – Vol. 58, № 4. – P. 362–372.
24. Dufour, D. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance / D. Dufour, V. Leung, C. M. Levesque. – Endodontic Topics. – 2010. – Vol. 22, № 1. – P. 2–16.
25. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations / P. C. Bogino [et al.]. – International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – Vol. 14, № 8. – P. 15 838–15 859.

К. Ю. Pesotskaya<sup>1</sup>, А. L. Lagonenko<sup>2</sup>, А. N. Evtushenkov<sup>1</sup>

## INFLUENCE OF THE *OHR*R GENE DELETION ON THE PRODUCTION OF VIRULENCE FACTORS BY THE PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *ERWINIA AMYLOVORA*

<sup>1</sup>Belarussian State University

4 Nezavisimosty Ave., 220030 Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Algimed Techno LLC

22/1, Logoisky trakt, 220090, Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: lagonenkoal@mail.ru

The MarR family (*Multiple Antibiotic Resistance*) of transcription factors regulates diverse genes involved in synthesis of virulence determinants, biofilm formation, multiple antibiotic resistance, resistance against many cellular toxins, including detergents, oxidative reagents and phenolic compounds. Using a one-step method for inactivation of chromosomal genes we constructed and characterized mutant carrying deletion of the *ohrR* gene. Inactivation of *ohrR* results in decreased cell viability after treatment with hydrogen peroxide, levan production and increased amylovan production. It is also shown that on pear shoots the *ohrR* deficient strain had reduced virulence compared to the wild type. In summary, the results of this study demonstrate that *OhrR* is a key regulator of the virulence of *Erwinia amylovora* and add new insights into the complex regulatory network that modulates the physiology and virulence of *Erwinia amylovora*.

**Keywords:** *Erwinia amylovora*, transcriptional regulator *OhrR*, virulence factors, exopolysaccharides, oxidative stress, hydrogen peroxide.

*Дата поступления в редакцию: 06 января 2023 г.*

И. М. Голоенко<sup>1</sup>, В. Г. Обьедков<sup>2</sup>, Т. С. Голубева<sup>2</sup>, Т. В. Докукина<sup>2</sup>, А. В. Ходжаев<sup>2</sup>

## АКТУАЛЬНОСТЬ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ПРИ АНТИПСИХОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ШИЗОФРЕНИИ

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»  
Республика Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27  
e-mail: goloenkoi@tut.by

<sup>2</sup>Государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр психического здоровья»  
Республика Беларусь, 220080, г. Минск, Долгиновский тракт, 152

Персонализированный подход в лекарственной терапии требует учета фармакогенетических особенностей пациентов. В успешности терапии шизофрении генетические факторы могут играть определяющую роль, если присутствует наследственное нарушение фармакокинетических и фармакодинамических процессов биотрансформации и воздействия антипсихотических лекарств. Фармакоген *CYP2D6* является одним из наиболее важных факторов, влияющих на метаболический статус пациента при длительном приеме нейролептиков. Согласно многочисленным исследованиям, у пациентов с медленным и быстрым метаболизмом выбор антипсихотической терапии на основе генетических тестов по гену *CYP2D6* сокращает риск побочных эффектов, отмены терапии и ее неэффективности. Однако внедрение алгоритмов фармакогенетического тестирования в рутинную клиническую практику ограничено возможностями выбора надежных генетических маркеров, оперативного проведения генетического тестирования, интерактивной передачи результатов для клинического применения. Необходим поиск удобных алгоритмов для взаимодействия генетиков и клиницистов. В статье рассмотрены генетические факторы ответа на антипсихотическую терапию, обобщены представленные в литературе данные применения генетического тестирования при назначении антипсихотиков, указаны существующие информационные базы данных, обосновано внесение генетического тестирования в алгоритм лечения шизофрении.

**Ключевые слова:** фармакогенетика, фармакогеномика, шизофрения, полиморфизм генов, цитохром *CYP2D6*, генетическое тестирование.

### Введение

Психические расстройства — это заболевания, которые вызывают нарушения в мышлении, поведении и эмоциональном состоянии человека. Они имеют высокополигенную генетическую архитектуру с плейотропными механизмами регулирования развития нервной системы, нейрогенеза и дифференцировки нейронов [1, 2]. Шизофрения является одним из наиболее изучаемых психических расстройств с высокой наследуемостью от 79 до 85% и распространенностью в мире около 1% [3]. В медикаментозной терапии шизофрении, как и при других пограничных расстройствах, используются антипсихотические лекарственные средства. Несмотря на то, что на протяжении последних 60 лет антипсихотики являются краеугольным камнем в лечении

шизофрении, у 20–30% пациентов данные лекарственные средства оказывают незначительное благотворное действие или вообще не оказывают его, а серьезные побочные эффекты и прекращение лечения встречаются довольно часто [4]. Фармакогенетические исследования представляют собой возможность улучшить состояние пациентов за счет прогнозирования побочных эффектов и реакции на лекарственные средства [3].

С момента открытия первого антипсихотика в 1952 г. было разработано множество антипсихотических препаратов, каждый из которых имеет различные фармакокинетические и фармакодинамические свойства [5]. Выбор подходящего антипсихотика, часто осуществляемый традиционным подходом «проб и ошибок», назначением двух, трех, или более

лекарственных средств, проблематичен как для пациента, так и для системы здравоохранения [3]. В то же время фармакологическое разнообразие антипсихотических препаратов должно позволять персонализировано назначать лекарственные средства, адаптированные как к генетическим особенностям пациента, так и к различной клинической картине и различным стадиям протекания хронического заболевания. Однако значительные успехи в исследовании и понимании генетических причин шизофрении за последние два десятилетия, меняющие представление об ее этиологии, пока не вовлечены в новые подходы к лечению этого расстройства [5]. В настоящее время в литературе обсуждается отсутствие необходимого комплекса объективных биомаркеров, в том числе и генетических, которые могли бы помочь как в диагностике данного расстройства, так и в предикции его начала, тяжести его течения и реакции на лечение [4]. Вопросы, касающиеся непосредственно фармакогенетического тестирования, применительно к рутинной клинической практике, затрагивают пока все этапы его осуществления: от наличия генетических маркеров, их выбора, различных алгоритмов с учетом популяционных [6, 7, 8], клинических и других особенностей пациентов до подготовки персонала [9], интерпретации результатов и согласованной связи с работой международных экспертных групп [10, 11, 12].

### Генетические факторы шизофрении

Шизофрения является комплексным заболеванием многофакторного происхождения с рядом симптомов, опосредованных генетическими и средовыми факторами [13]. Представление о полигенности архитектуры шизофрении основано сегодня на данных о сочетании распространенных и редких полиморфных вариантов генов риска расстройства [4].

Множество распространенных вариантов с малым патогенным эффектом сочетается с редкими вариантами с более значимыми эффектами. Распространенные варианты генетического риска связаны с нарушением регуляции биологических процессов развития нервной системы, возбудимости нейронов, синаптической функции и иммунной системы [4]. Предполагается, что множественные вари-

анты некодирующей ДНК в энхансерах и промоторах комбинаторно влияют на экспрессию генов и регуляторные механизмы [14]. Накапливаются данные о механизмах нарушения регуляции экспрессии генов и тканеспецифических транскрипционных программ на уровне пространственной конформационной 3D организации хроматина, что дополняет общую картину архитектуры шизофрении [15].

В течение последнего десятилетия активные исследования полногеномного поиска ассоциаций (GWAS от англ. genome-wide association study) и секвенирования экзома выявили более 200 локусов, ассоциированных с шизофренией [16, 17]. Использование GWAS в наиболее масштабных по объему выборках исследования позволило обозначить количество генетических локусов, связанных с шизофренией, у лиц европейского и восточноазиатского происхождения (145 и 113). В различных популяциях с данным расстройством ассоциированы локусы общих генетических вариантов, повышающих риск развития шизофрении и имеющих очень схожие эффекты у восточноазиатских и европейских предков [18, 19, 20, 21]. Анализ данных GWAS Консорциума психиатрической геномики позволил увеличить число локусов, сцепленных с основными однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП), до 414 [22]. Из более позднего анализа данных GWAS наиболее сильная генетическая корреляция отмечена у шизофрении с биполярным расстройством [23, 24]. Благодаря мета-анализу целых экзомов 24 248 случаев и 97 322 контрольных групп недавно определены ультра-редкие кодирующие варианты в десяти генах, существенно повышающие риск развития шизофрении, и в 32 генах с менее выраженным риском. Данные гены имеют наибольшую экспрессию в нейронах центральной нервной системы и обладают разнообразными молекулярными функциями, которые включают формирование, структуру и функцию синапса. Авторы подчеркивают возможную роль связи с риском шизофрении генов субъединицы рецептора NMDA *GRIN2A* и субъединицы рецептора AMPA *GRIA3*, задействованных в дисфункции глутаматергической системы, для подтверждения главной глутаматергической гипотезы в патогенезе шизофрении [25].

Общие полиморфные варианты риска пси-

хических расстройств и их патогенеза также связаны с клиническим ответом на антипсихотическую терапию. Одно из последних масштабных исследований GWAS полигенного риска резистентности к терапии, объединившее ученых из 16 стран Америки и Европы, включало 85 490 участников. Подтверждено, что резистентность к терапии шизофрении является полигенным признаком с наследуемостью от 1 до 4% [26]. Китайским ученым методом GWAS в выборке, включающей 2 413 пациентов с шизофренией из 32 психиатрических больниц Китая, удалось установить пять новых ОНП для генов *MEGF10*, *SLC1A1*, *PCDH7*, *CNTNAP5*, *TNIK* (rs72790443, rs9291547, rs1471786, rs12711680, rs6444970), демонстрирующих общегеномные значимые ассоциации с общим ответом на антипсихотическое лечение. Отдельно для генов *CACNA1C*, *SLC1A1* и *CNTN4* были обнаружены связи с ответом на лечение оланзапином, рисперидоном и арипипразолом [27]. Роль различных полиморфных локусов в ответе на терапию шизофрении представлена анализом данных GWAS исследований и фармакогенетических исследований по отдельным локусам генов, задействованных в фармакокинетике (*CYP2D6*, *CYP1A2*, *CYP3A4* и *CYP3A5*, *GST-M1*, *GST-T1*, *GST-P1*, *MDR1* и др.) и фармакодинамике лекарственных средств (*DRD2*, *DRD3*, *COMT*, *DAT1*, *5HTTLPR* и др.) [3, 27, 28]. Однако надежность обнаруженных связей с полиморфными локусами и возможность их универсального использования в различных популяциях в качестве маркеров предикции резистентности и осложнений терапии зачастую ставится под сомнение. В связи с этим популяционные фармакогенетические исследования приобретают все большую значимость для поиска точных генетических предикторов [29, 30, 31]. Для популяции белорусов при изучении связи генов контроля нейромедиаторных путей головного мозга и генов детоксикации ксенобиотиков с ответом на терапию антипсихотиками были выявлены полиморфные локусы риска в генах *DRD2 / ANKK1* (rs1800497), *CYP2D6* (rs3892097), *MDR1* (rs1045642), *GSTM1* (del), *GSTT1* (del) [32]. Полиморфный локус rs3892097 гена *CYP2D6* также обнаружил связь с частой госпитализацией пациентов с шизофренией [33].

## Обоснованность фармакогенетического тестирования

Неэффективность действия антипсихотиков и развитие серьезных побочных реакций на препараты длительного применения требует поиска новых лекарственных средств. Однако этот поиск, как отмечалось, затруднен отсутствием понимания механизмов на этапе между генетическими нарушениями и патофизиологией шизофрении [4]. На данном этапе особенно необходим персонализированный подход при выборе активно используемых антипсихотических препаратов. Однако современные терапевтические алгоритмы лимитируют подходы врача в лечении психических расстройств [34]. В основе современной концепции медицины, или 4П-медицины, лежат четыре понятия, каждое из которых начинается с латинской буквы «Р». В переводе с английского эти буквы означают: prediction — предупреждение, prevention — предотвращение, personalization — персонализированный подход и participation — участие и полное понимание процессов [35]. В психиатрии одной из задач 4П-медицины является включение в терапевтические алгоритмы возможности фармакогенетического тестирования. Обоснование необходимости тестирования дано в инструкциях и патентах, разработанных совместно Республиканским научно-практическим центром психического здоровья и Институтом генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси [36, 37, 38]. Кроме того, такие обоснования можно получить на веб-сайте общедоступной онлайн базы знаний по фармакогеномике (PharmGKB), основанной в Стэнфордском университете в 2000 г. с целью сбора и анализа данных от различных информационных ресурсов и международных консорциумных групп, в том числе Международного консорциума по психиатрической геномике (PCG).

Процесс внедрения в рутинную практику генетического тестирования должен опираться на создание для внутреннего пользования клинических баз данных с генотипами пациентов по основным полиморфным локусам риска тех генов, которые связаны с нежелательными лекарственными реакциями и эффективностью антипсихотической терапии. Это непростая и не быстрая для всей системы здравоохране-

ния задача, с учетом отсутствия пока собственных генетических лабораторий в клиниках, однако должна решаться путем поиска других возможных способов тестирования частично на платной основе, частично за счет выделяемых бюджетных средств.

Если врачу, назначающему терапию, будут доступны данные с генотипами пациентов по основным полиморфным локусам риска и обновляемый в базе PharmGKB список подлежащих тестированию лекарственных препаратов с рекомендациями, то успешность выбора повысится [34, 39, 40, 41].

Принятие решения о проведении генетического тестирования с необходимым учетом отечественных разработок во многом облегчается сегодня PharmGKB-ресурсом. Необходимость тестирования в парах лекарство – ген обозначается категориями требуемого «required», рекомендуемого «recommended», целесообразного «actionable», либо информативного «informative» [42].

Для этого, опираясь на принятую PharmGKB классификацию «фармакогенетических» препаратов [43], необходимо убедиться в принадлежности антипсихотика к какой-либо из перечисленных категорий. Все категории тестирования присваиваются лекарственным препаратам по мере доказательства клинической значимости генетического тестирования. Эта информация от PharmGKB является общедоступной, постоянно обновляется и основана на мнениях экспертов, данных из опубликованных исследований и официальных инструкций к использованию лекарственных препаратов [44].

По заключению PharmGKB, на настоящий момент в ряд антипсихотиков с доказанным результатом тестирования включено 12 препаратов: Pimozide с категорией «требуемого» и 11 антипсихотиков с категориями «целесообразного» и «информативного» генотипирования (табл. 1). Как видно из таблицы 1, PharmGKB-ресурс официально рекомендует для тестирования фармакоген *CYP2D6* в паре ген – лекарство. Перед назначением Olanzapine также рекомендовано тестирование по гену *Cyp1A2*.

## **CYP2D6 — важнейший фармакоген в антипсихотической терапии**

Генотипирование по гену цитохрома P450

*CYP2D6* обоснованно является первым необходимым шагом для фармакогенетического тестирования перед назначением ряда антипсихотиков и других лекарственных препаратов. Из множества ферментов цитохрома P450, которые осуществляют широкий спектр окислительных метаболических процессов, включая биотрансформацию эндогенных молекул, пищевых компонентов и лекарств или пролекарств [45, 46], *CYP2D6* является одним из наиболее широко изученных и, возможно, наиболее важных ферментов, метаболизирующих лекарственные средства [47]. Этот важнейший фармакоген, состоящий из 9 экзонов и 8 интронов и локализованный в 22 хромосоме (локусе 22q13.1) вместе с двумя псевдогенами *CYP2D7*, *CYP2D8P*, высоко схожими по нуклеотидному составу и представляющими общий кластер генов, детерминирует метаболизм ~ 20% обычно используемых лекарственных средств в широком спектре медицинских дисциплин, включая психиатрию, обезболивание, онкологию и кардиологию [48]. Клиническое тестирование по гену *CYP2D6* становится все более доступным и поддерживается практическими рекомендациями [49].

С высоким полиморфизмом данного гена связано изменение функции фермента *CYP2D6*, в результате чего могут возникать побочные реакции на лекарственные средства и значительно снижаться эффективность терапии. На сегодняшний день известные фармакогеномные сообщества разработали клинические рекомендации по меньшей мере для 48 препаратов, имеющих субстрат *CYP2D6*. В терапевтических рекомендациях прогнозируется риск низкой эффективности и осложнений в зависимости от генотипа пациента по гену *CYP2D6*, определяющего вероятную активность фермента [48].

Данный ген детерминирует скорость метаболизма 40% антипсихотиков, а также 85% антидепрессантов [50]. Каждый пациент имеет определенный вариант генотипа, сочетающий пару аллелей гена, детерминирующих вместе степень активности фермента. Аллели *CYP2D6* могут определять отсутствие (poor metabolism — PM), пониженную или промежуточную (intermediate metabolism — IM), нормальную (extensive metabolism — EM)

**Таблица 1**

Перечень антипсихотиков с рекомендованным PharmGKB генетическим тестированием перед назначением

Ген	Категория	Препарат	Источник
<i>CYP2D6</i>	требуемое	Pimozide	FDA
<i>CYP2D6</i>	целесообразное	Aripiprazole	EMA, FDA, HCSC, Swissmedic
<i>CYP2D6</i>	целесообразное	Clozapine	FDA
<i>CYP2D6</i>	целесообразное	Fluoxetine / olanzapine	FDA
<i>CYP2D6</i>	целесообразное	Perphenazine	FDA, PMDA
<i>CYP2D6</i>	целесообразное	Thioridazine	FDA
<i>CYP2D6</i>	целесообразное	Haloperidol	Swissmedic
<i>CYP2D6</i>	целесообразное	Sertindole	Swissmedic
<i>CYP2D6, CYP1A2</i>	целесообразное	Olanzapine	EMA
<i>CYP2D6</i>	информативное	Paliperidone	FDA, Swissmedic
<i>CYP2D6</i>	информативное	Risperidone	FDA, HCSC, Swissmedic
<i>CYP2D6</i>	информативное	Zuclophenthixol	Swissmedic

**Примечание.** FDA — US Food and Drug Administration (Управление по контролю за продуктами и лекарствами США); EMA — European Medicines Agency (Европейское агентство по лекарственным средствам); HCSC — Health Canada (Santé Canada) (Здравоохранение Канады), Swissmedic — Swiss Agency of Therapeutic Products (Швейцарское агентство Терапевтических продуктов); PMDA — Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japan (Агентство по фармацевтическим препаратам и медицинским изделиям, Япония), <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA452233/labelAnnotation>

и повышенную (ultrarapid metabolism — UM) активность фермента, создавая широкий спектр изменчивости его активности у отдельных людей и между популяциями. Алгоритмы стандартного подхода для перевода диглобтипов в прогнозируемый фенотип, а также частоты встречаемости аллелей и генотипов со сниженной или повышенной ферментативной активностью для различных популяций обсуждаются в литературе [7]. Низкий статус метаболитора распространен в среднем у 0,4–5,4% населения планеты; промежуточный и нормальный статусы колеблются соответственно в пределах от 0,4 до 11% и от 67 до 90%. Статус сверхбыстрого метаболитора, как считается, могут иметь от 1 до 21% населения [6, 7].

У индивидов европейского происхождения низкий метаболизм по данному гену, как правило, детерминированный аллелем

\*4, встречается с частотой 23,5%. Более 20% европейцев — носители нефункциональных гаплотипов, в число которых наряду с аллелем \*4 входят другие нулевые аллели \*3, \*5, \*41 [6, 7]. Для таких пациентов рекомендовано назначать низкие дозы антипсихотиков и антидепрессантов-субстратов фермента CYP2D6, либо препараты, не являющиеся субстратами данного цитохрома [51, 52]. От 1 до 3% европейского населения может иметь ультрабыстрый метаболизм, обусловленный дублированными аллелями нескольких копий (\*1xN, \*2xN) гена [6]. Назначение стандартных доз препаратов, являющихся субстратами для CYP2D6, пациентам с ультрабыстрым метаболизмом, возможно, будет неэффективным. Однако в рекомендациях PharmGKB для таких пациентов дозы препаратов пока не меняются. Для наглядности можно привести пример рекомендаций из базы данных

PharmGKB-ресурса для Pimozide, антипсихотического препарата с категорией «требуемого генотипирования» (табл. 2) [53].

Таким образом, более чем у 20% пациентов европейского происхождения учет фактора генотипа только по гену *CYP2D6* дает шанс избежать неэффективной терапии и осложнений. А в условиях клинической практики, наличие заключения даже только по гену цитохрома *CYP2D6* может принести значительную пользу. Например, алгоритм принятия решений и терапевтическая тактика конкретного клинического случая описаны в публикации Корчагиной Н. с соавторами [34]. По результатам фармакогенетического тестирования была показана возможность коррекции дозировки антидепрессанта и замена антипсихотика, так как наличие у пациентки генотипа *CYP2D6* 1\*/4\* (A/G) было связано со снижением скорости метаболизма ряда препаратов, в результате чего повышался риск развития побочных эффектов. Плохая переносимость терапии приводила к преждевременной отмене терапии, что утяжеляло течение заболевания [34].

В обзоре Кибитова А. с соавторами [51] анализируется практическая возможность предварительного фармакогенетического прогноза

индивидуальной эффективности и безопасности антипсихотиков до их назначения. Авторами отмечается, что фармакогенетические тесты для цитохрома *CYP2D6*, метаболизирующего большинство антипсихотических препаратов, уже включены в зарубежные клинические рекомендации для галоперидола, арипипразола, рисперидона, перфеназина, зуклопентиксола, клозапина, тиоридазина. Однако до появления результатов отечественных доказательных широкомасштабных исследований такие рекомендации должны интерпретироваться с осторожностью [51].

Для оценки степени генетически обусловленного риска лекарственно-индуцированных акатизии и паркинсонизма при антипсихотической терапии шизофрении в популяции белорусов установлены частоты встречаемости аллеля А (22,9%) и генотипа А/Г (32,1%) полиморфного локуса *CYP2D6*\*4. Данный локус явился маркером риска лекарственно-индуцированного паркинсонизма для индивидов с генотипом А/Г ( $p = 0,01$ ; ОШ = 2,84) [32]. На основании этого носителям аллеля А (*CYP2D6*\*4) было рекомендовано назначать более низкие дозы *CYP2D6*-зависимых лекарственных средств: на  $\frac{1}{4}$  ниже для гетерозигот (А/Г) и  $\frac{1}{2}$  для гомозигот (А/А) по *CYP2D6*\*4,

Таблица 2

Назначение доз Pimozide, рекомендуемое PharmGKB в зависимости от метаболического статуса по *CYP2D6*

Метаболический статус	Вероятное изменения концентрации препарата в плазме крови	Рекомендации по дозированию
UM	Возможно снижение концентрации пимозиды. Однако нет никаких свидетельств снижения эффективности	не требуется изменять дозу
IM	Теоретически повышается риск увеличения концентрации пимозиды в плазме крови. Необходимо следовать рекомендациям по дозировке	Рекомендуется не превышать дозы (80% от стандартной максимальной дозы): 12 лет и старше: 16 мг/сут младше 12 лет: 0,08 мг/кг в день до максимальной дозы 3 мг/сут
PM	Теоретически повышается риск увеличения концентрации пимозиды в плазме крови. Необходимо следовать рекомендациям по дозировке	Рекомендуется не превышать дозы (50% от стандартной максимальной дозы): 12 лет и старше: 10 мг/сут младше 12 лет: 0,05 мг/кг в день до максимальной дозы 2 мг/сут

**Примечание.** UM — ultrarapid metabolism (ультрабыстрый метаболизм); IM — intermediate metabolism (промежуточный метаболизм); PM — poor metabolism (бедный метаболизм)

или назначать CYP2D6 независимые антипсихотики [38]. Таким образом, решение вопроса более безопасного лечения для носителей полиморфного локуса *CYP2D6*\*4 может быть связано с изменением режима дозирования антипсихотиков или с заменой принимаемого пациентом антипсихотика на другой, метаболизм которого контролируется не только ферментами CYP2D6, но и семействами других печеночных ферментов.

Курылев А. с соавторами [54] в исследовании фармакоэкономических аспектов генотипирования *CYP2D6* в практике психиатрического стационара экономически обосновали применение фармакогенетического подхода в выборе и назначении антипсихотической терапии. Для такого подхода характерны меньшие суммарные прямые медицинские затраты за счет укорочения времени подбора оптимального режима антипсихотической терапии, и, как следствие, уменьшение длительности пребывания пациента в стационаре. Показано, что затраты на проведение фармакогенетического тестирования *CYP2D6* составляют менее 1% суммарных прямых медицинских затрат на лечение пациентов в условиях психиатрического стационара [54].

### Алгоритмы и методология фармакогенетического тестирования

Для возможности клинического внедрения генетического тестирования алгоритмы клинического рабочего процесса должны объединять все этапы на пути от тестирования до назначения терапии. Несмотря на существующие рекомендации для назначения терапии, основанные на генетических вариантах, нет единого мнения о валидированной методологии клинического генотипирования, необходимы также справочники наборов генетических вариантов анализа и настраиваемый автоматический перевод данных в гаплотипы. Такие алгоритмы разрабатываются [55].

Генотипирование *CYP2D6* является необходимым, но не всегда достаточным условием для прогнозирования риска побочных эффектов и неэффективности терапии антипсихотиками. В настоящее время предлагается главным образом коммерческое тестирование с анализом полиморфных локусов одного или нескольких генов.

Первый тест для выявления аллельной вариации *CYP2D6*, аллелей \*3 и \*4, был опубликован в 1990 г. [56]. Сегодня существуют различные методы определения гаплотипа *CYP2D6*, включая методы, которые могут обнаруживать гибридные структуры и количественно определять полиморфизм числа копий (CNV). Коммерческое тестирование обычно предлагает генотипирование некоторых основных аллелей гена *CYP2D6* (\*2, \*4, \*5, \*10, \*17) [48]. Например, платформа AmpliChip *CYP2D6* genechip представляет собой анализ гибридизации микрочипов, который может обнаруживать *CYP2D6*\*2, \*3, \*4, \*5, \*6, \*9, \*10, \*35 и \*41 и дубликаты этих ОНП [57]. GenoChip *CYP2D6* mascoarray представляет собой микрочип, который может обнаруживать *CYP2D6*\*3, \*4, \*6, \*7, \*8, \*9, \*10, \*11, \*17, \*29, \*41, делецию гена (\*5) и копияность гена (\*xN) [58].

Из мультигенного тестирования наиболее значимыми являются генетические тесты, включающие *CYP1A2*, *CYP2D6* и *CYP2C19*. Единственным одобренным FDA генетическим тестом является AmpliChip™, который представляет собой продукт на основе микрочипов для оценки активности *CYP2D6* и *CYP2C19* [59]. Комбинаторные анализы GeneSight® (США) обеспечивают охват около 50 аллелей генов, вовлеченных в фармакокинетику различных лекарств, включая аллели *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2B6*, *CYP3A4* и *CYP1A2*, а также некоторых генов, вовлеченных в их фармакодинамику (*5HTT*, *HTR2A*, *COMT*, *CACNA1C*, *MTHFR*). На основе информации об этих генетических биомаркерах создается индивидуальный отчет, в котором различные психотропные препараты делятся на зеленую корзину для рекомендуемого использования, желтую корзину для использования с осторожностью и красную корзину для использования с особой осторожностью и частым мониторингом. Анализ Genescept™ (Genomind®) также обеспечивает тестирование биомаркеров фармакокинетики (*CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP3A4*) и маркеров фармакодинамики (*5HT*-транспортер, *5HT2C*-рецепторы, *DRD2*, *COMT*, *CACNA1C*, *ANKK3* и *MTHFR*). Как и в отчете GeneSight, результаты каждого пациента предоставляются заказывающему клиницисту вместе с предлагаемыми вариантами лечения. DMET™ Plus Solution — это

один из крупнейших коммерчески доступных генетических анализов примерно для 2 000 вариантов генов ферментов и транспортеров, метаболизирующих лекарственные средства. Однако DMET™ Plus, как платформа для выявления генетических рисков, пока не тестирована на клиническую эффективность при применении психотропных препаратов [59].

Более чем для 25 генов разработаны и научно обоснованы рекомендации различных экспертных групп, таких как Консорциум по внедрению клинической фармакогенетики (CPIC), Голландская рабочая группа по фармакогенетике (DPWG) и Канадская сеть фармакогеномики по безопасности лекарств (CPNDS). Однако только пять из этих генов (*CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *HLA-A*, *HLA-B*) связаны с фармакокинетикой, эффективностью или переносимостью одного или нескольких психиатрических препаратов. Канадские исследователи в последнем обзоре по фармакогенетике сообщают, что практически все фармакогенетические тест-панели, доступные в Канаде, включают *CYP2D6*, *CYP2C19* и *CYP2C9* [60]. Их озабоченность вызывает то, что лаборатории часто тестируют и сообщают о результатах для генов, которые имеют ограниченную или почти отсутствующую связь с фармакокинетикой, эффективностью или переносимостью лекарств. Примеры генов, обычно появляющихся в психиатрических тестовых группах, которые, по мнению канадских исследователей, не имеют достаточных доказательств или разработанных экспертами рекомендаций, включают: *ABCBI*, *ADRA2A*, *ANK3*, *ANKK1*, *BDNF*, *CACNA1C*, *COMT*, *CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP2C8*, *DRD2*, *FKBP5*, *GNB3*, *GRIK1*, *HTR2A*, *HTR2C*, *MC4R*, *MTHFR* и *SLC6A4*. Тестовые панели, включающие эти гены, эксперты советуют рассматривать критически, а рекомендации, связанные с этими генами, использовать с осторожностью [60].

В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси совместно с Республиканским научно-практическим центром психического здоровья разработан и запатентован способ прогнозирования риска акатизии и паркинсонизма, индуцированных антипсихотической терапией шизофрении с алгоритмом диагностики предрасположенности к экстрапирамидным осложнениям при длительном при-

еме антипсихотиков. Панель генетических маркеров, включающая тестирование *DRD2 / ANKK1* (rs1800497), *CYP2D6* (rs3892097), *MDR1* (rs1045642), *GSTM1* (del), *GSTT1* (del) для предикции развития антипсихотикиндуцированных паркинсонизма и акатизии, позволяет дифференцировать риски осложнений и персонализировать подбор лекарственных препаратов [38].

Панели фармакогенетических тестов антипсихотического ответа пока широко не используются [3], несмотря на то, что фармакогенетическое тестирование уже было успешно внедрено многочисленными медицинскими центрами и системами здравоохранения по всей Северной Америке, Европе и Азии [5]. В то же время аналогичные тестовые панели уже используются в лечении депрессивных расстройств [3].

Непрерывное развитие новых технологий генотипирования требует осознания их потенциальных преимуществ и ограничений, касающихся использования в фармакогеномике. Пока в клинической практике наиболее часто используются панели однонуклеотидных вариантов, которые содержат предварительно выбранную панель генетических вариантов. Так как такие панели не требуют продолжительного времени для выполнения и просты в интерпретации результатов, это делает их пригодными для клинической практики. Однако их способность оценивать редкие и структурные варианты ограничена. Секвенирование следующего поколения (NGS) и секвенирование с длительным считыванием являются многообещающими технологиями в области исследований фармакогеномики. Как NGS, так и секвенирование с длительным считыванием часто предоставляют больше данных и больше возможностей в отношении расшифровки структурных и редких вариантов по сравнению с однонуклеотидными панелями — в частности, в отношении количества вариантов, которые могут быть идентифицированы, а также возможности поэтапного определения гаплотипа. Тем не менее, несмотря на то, что они полезны для исследований, не все данные секвенирования пока могут быть применены в клинической практике [61].

Сегодня фармакогенетика превратилась в самостоятельную область приложения ген-

но-лекарственных взаимодействий к терапевтической практике. За этот период в область фармакогенетики были интегрированы методы таких дисциплин, как биохимия, молекулярная биология, статистика и компьютерные науки. На современном этапе, когда технический прогресс позволяет оценивать пополняющийся спектр фармакологических вариантов, многомерные наборы данных omics, в свою очередь, могут улучшать идентификацию, функциональную валидацию и понимание механизмов взаимодействия между генами и лекарствами. Появляются новые стратегии перепрофилирования и интеграции молекулярных и клинических данных, полученных из биобанков, для получения информации, необходимой для клинического внедрения фармакогенетики [62].

### Заключение

Персонализированный подход при назначении антипсихотической терапии — это возможность снижения риска побочных эффектов, отмены приема антипсихотиков и отсутствия терапевтического ответа на основе учета у психиатрических больных их фармакогенетических особенностей. Проведение генетического тестирования и выбор генетических маркеров должны в первую очередь включать тестирование по фармакогену *CYP2D6* для определения метаболического статуса пациента. В настоящее время разработаны протоколы и инструкции, позволяющие интерпретировать результаты генетического тестирования при выборе антипсихотической терапии. Однако для успешного внедрения данных протоколов в реальную клиническую практику необходимо взаимодействие генетиков и клиницистов для интерпретации результатов при назначении терапии.

### Список используемых источников

1. Sullivan P. Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications / M. Daly, M. O'Donovan. — Nature Reviews Genetics, 2012. — Vol. 13(8). — P. 537–551.
2. A comprehensive gene-centric pleiotropic association analysis for 14 psychiatric disorders with GWAS summary statistics / H. Lu [et al.]. — BMC Medicine, 2021. — Vol. 19 (1). — 314 p.
3. Toward personalized medicine in schizophre-

nia: Genetics and epigenetics of antipsychotic treatment / A. Lisoway [et al.]. — Schizophrenia Research, 2021. — Vol. 232. — P. 112–124.

4. Smeland O. The polygenic architecture of schizophrenia — rethinking pathogenesis and nosology / O. Frei, A. Dale, O. Andreassen. — Nature Reviews Neurology, 2020. — Vol. 16(7). — P. 366–379.

5. Carton L. Towards personalized pharmacology: Antipsychotics and schizophrenia / R. Bordet, F. Montastruc, R. Guilhaumou. — Therapie, 2021. — Vol. 76(2). — 137–147.

6. Zhou Y. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects / M. Ingelman-Sundberg, V. Lauschke. — Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2017. — Vol. 102(4). — P. 688–700.

7. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations / A. Gaedigk. [et al.]. — Genetics in Medicine, 2017. — Vol. 19(1). — P. 69–76.

8. Towards population-specific pharmacogenomics in the era of next-generation sequencing / X. Ji [et al.]. — Drug Discovery Today, 2021. — Vol. 26(8). — P. 1 776–1 783.

9. Pharmacogenomics Implementation Training Improves Self-Efficacy and Competency to Drive Adoption in Clinical Practice / F. Adesta [et al.]. — Frontiers in Pharmacology, 2021. — Vol. 12. — 684 907 p.

10. Recommendations for Clinical CYP2D6 Genotyping Allele Selection: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, College of American Pathologists, Dutch Pharmacogenetics Working Group of the Royal Dutch Pharmacists Association, and the European Society for Pharmacogenomics and Personalized Therapy / V. M. Pratt [et al.]. — The Journal of Molecular Diagnostics, 2021. — Vol. 23(9). — P. 1 047–1 064.

11. What Are the Barriers and Enablers to the Implementation of Pharmacogenetic Testing in Mental Health Care Settings? / A. Jameson [et al.]. — Frontiers in Genetics, 2021. — Vol. 12. — 740 216 p.

12. Gammal R. The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium: 10 Years Later / M. Whirl-Carrillo, J. Hoffman, K. Caudle. — Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2020. — Vol. 107(1) — P. 171–175.

13. Sawa, A. Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease / S. Snyder. — Science, 2002. — Vol. 296. — P. 692–695.

14. Synergistic effects of common schizophrenia risk variants / N. Schrode [et al.]. — Nature Genet-

ics, 2019. – Vol. 51. – P. 1 475–1 485.

15. Cis-regulatory hubs: a new 3D model of complex disease genetics with an application to schizophrenia / L. Mangnier [et al.]. – Life Science Alliance, 2022. – Vol. 5(5). – P. 202101156.

16. Cell type-specific mechanism of Setd1a heterozygosity in schizophrenia pathogenesis / R. Chen [et al.]. – Science Advances, 2022. – Vol. 8(9).

17. Exome sequencing in schizophrenia-affected parent-offspring trios reveals risk conferred by protein-coding de novo mutations / D. Howrigan [et al.]. – Nature Neuroscience, 2020. – Vol. 23. – P. 185–193.

18. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. – Nature, 2014. – Vol. 511(7510). – P. 421–427.

19. Common schizophrenia alleles are enriched in mutation intolerant genes and in regions under strong background selection / A. Pardiñas [et al.]. – Nature Genetics, 2018. – Vol. 50. – P. 381–389.

20. Genome-wide association analysis identifies 30 new susceptibility loci for schizophrenia / Z. Li [et al.]. – Nature Genetics, 2017. – Vol. 49(11). – P. 1 576–1 583.

21. Comparative genetic architectures of schizophrenia in East Asian and European populations / M. Lam [et al.]. – Nature Genetics, 2019. – Vol. 51(12). – P. 1 670–1 678.

22. Leveraging genomic annotations and pleiotropic enrichment for improved replication rates in schizophrenia GWAS / Y. Wang [et al.]. – PLoS Genetics, 2016. – Vol. 12. – P. e1005803.

23. Genome-wide association study identifies 30 loci associated with bipolar disorder / E. Stahl [et al.]. – Nature Genetics, 2019. – Vol. 51(5). – P. 793–803.

24. Genome-Wide Association Studies of Schizophrenia and Bipolar Disorder in a Diverse Cohort of US Veterans / T. Bigdeli [et al.]. – Schizophrenia Bulletin, 2021. – Vol. 47(2). – P. 517–529.

25. Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia / T. Singh [et al.]. – Nature, 2022. – Vol. 604(7906). – P. 509–516.

26. Interaction Testing and Polygenic Risk Scoring to Estimate the Association of Common Genetic Variants With Treatment Resistance in Schizophrenia / A. Pardiñas [et al.]. – JAMA Psychiatry, 2022. – Vol. 79(3). – P. 260–269.

27. Chinese Antipsychotics Pharmacogenomics Consortium. Five novel loci associated with antipsychotic treatment response in patients with schizophrenia: a genome-wide association study / H. Yu

[et al.]. – The Lancet Psychiatry, 2018. – Vol. 5(4). – P. 327–338.

28. Polygenic overlap between schizophrenia risk and antipsychotic response: a genomic medicine approach / D. Ruderfer [et al.]. – The Lancet Psychiatry, 2016. – Vol. 3(4). – P. 350–7.

29. Maruf A. Approaches and hurdles of implementing pharmacogenetic testing in the psychiatric clinic / Bousman CA. – Psychiatry and Clinical Neurosciences, 2022. – Vol. 1(2). – P. e26.

30. Wright G. The global spectrum of protein-coding pharmacogenomic diversity / B. Carleton, M. Hayden, C. Ross. – The Pharmacogenomics Journal, 2018. – Vol. 18(1). – P. 187–95.

31. Zhou Y. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects / M. Ingelman-Sundberg, V. Lauschke. – Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2017. – Vol. 102(4). – P. 688–700.

32. Связь риска возникновения острых лекарственно индуцированных экстрапирамидных расстройств при антипсихотической терапии параноидной шизофрении с полиморфизмом генов нейрометаболизма и системы детоксикации ксенобиотиков / О. Горгун [и др.]. – Военная медицина, 2019. – Т. 1. – С. 32–40.

33. Possible association of polymorphism *cyp2d6*\*4 with frequent hospital stay of patients with schizophrenia / T. Golubeva [et al.]. – Polish Journal of Applied Sciences, 2021. – Vol. 6(2). – P. 29–33.

34. Корчагина Н. Фармакогенетический тест в практике врача-психиатра: алгоритм принятия решений и терапевтическая тактика на примере клинического случая / Э. Мазо, А. Кибитов. – Социальная и клиническая психиатрия, 2019. – Т. 29(2). – С. 51–7.

35. Hood L. Systems biology and p4 medicine: past, present, and future. – Rambam Maimonides Medical Journal, 2013. – Vol. 4(2). – P. e0012.

36. Метод прогноза экстрапирамидных расстройств (ЭПР) при терапии шизофрении лекарственными средствами галоперидол (Haloperidol) и флуфеназин (Fluphenazine) по результатам генотипирования полиморфного локуса *CYP2D6*\*4 системы цитохрома P-450 / В. Обьедков, О. Скугаревский, И. Голоенко. – Инструкция по применению, Минск. 2014. – 9 с.

37. Метод определения вероятности острых экстрапирамидных лекарственно-индуцированных осложнений у пациентов с параноидной шизофренией / О. Горгун [и др.]. – Инструкция по

применению, 2019. – 12 с.

38. Способ прогнозирования риска акатизии и паркинсонизма, индуцированных антипсихотической терапией шизофрении / О. Давыденко [и др.]. – Патент, 2020. – 10 с.

39. Case Report: Pharmacogenetics Applied to Precision Psychiatry Could Explain the Outcome of a Patient With a New CYP2D6 Genotype / E. Marcos-Vadillo [et al.]. – *Frontiers in psychiatry*, 2022. – Vol. 12. – P. 830608.

40. Фармакогенетика шизофрении в реальной клинической практике: клинический случай / Р. Насырова [и др.]. – *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*, 2018. – Т. 10(4). – С. 88–93.

41. Usefulness of Pharmacogenetic Analysis in Psychiatric Clinical Practice: A Case Report / M. Franco-Martin [et al.]. – *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 2018. – Vol. 16(3). – P. 349–357.

42. <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA452233/labelAnnotation>

43. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine / M. Whirl-Carrillo [et al.]. – *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 2012. – Vol. 92(4). – P. 414–7.

44. Clinical Relevance of a 16-Gene Pharmacogenetic Panel Test for Medication Management in a Cohort of 135 Patients / D. Niedrig [et al.]. – *Journal of Clinical Medicine*, 2021. – Vol. 10(15). – 3200 p.

45. Turner A. J., Sangkuhl K., Whirl-Carrillo M., Agúndez J. A. G., Black J. L., Dunnenberger H. M., Ruano G., Kennedy M. A., Phillips M. S., Hachad H., Klein T. E., Gaedigk A. – *PharmVar GeneFocus: CYP2D6* / C. Nofziger [et al.]. – *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2020. – Vol. 107(1). – P. 154–170.

46. Nebert D. Human cytochromes P450 in health and disease / Wikvall K., Miller W. – *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013. – Vol. 368(1612). – P. 20120431.

47. Owen R. Cytochrome P450 2D6 / K. Sangkuhl, T. Klein, R. Altman. – *Pharmacogenet Genomics*. 2009. – Vol. 19(7). – P.559–62.

48. A Review of the Important Role of CYP2D6 in Pharmacogenomics / C. Taylor [et al.]. – *Genes*, 2020. – Vol. 11(11). – P. 1 295.

49. Yang Y. Sequencing the CYP2D6 gene: from variant allele discovery to clinical pharmacogenetic testing / M. Botton, E. Scott, S. Scott. – *Pharmacogenomics*, 2017. – Vol. 18(7). – P. 673–685.

50. Sacabelos R. Genomics and pharmacogenomics of schizophrenia / R. Martínez-Bouza. – *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2011. – Vol. 17(5). – P. 541–565.

51. Кибитов, А. Фармакогенетический подход к повышению эффективности и безопасности антипсихотической фармакотерапии шизофрении / Д. Иващенко, Д. Сычев. – *Современная терапия психических расстройств*, 2017. – Т. 1. – С. 2–13.

52. Интерпретация результатов фармакогенетического тестирования у пациентов с психическими и поведенческими расстройствами при назначении психотропных лекарственных средств: методическое пособие / Т. Докукина [и др.]. – Минск: Мисанта, 2016. – С. 54.

53. <https://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166182819>

54. Курылев А. Генотипирование CYP2D6 в практике психиатрического стационара — фармакоэкономические аспекты / Б. Андреев, А. Колбин, О. Лиманкин. – *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*, 2018. – Т. 11(1). – С. 19–26.

55. Methodology for clinical genotyping of CYP2D6 and CYP2C19 / H. Carvalho [et al.]. – *Translational Psychiatry*, 2022. – Vol. 12(1). – P. 94.

56. Heim M. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification / U. Meyer. – *Lancet*, 1990. – Vol. 336(8714). – P. 529–32.

57. Kirchheiner J., Armstrong V. W., Luthe H., Tzvetkov M., Brockmöller J., Oellerich M. AmpliChip CYP450 GeneChip: a new gene chip that allows rapid and accurate CYP2D6 genotyping / T. Heller [et al.]. – *Therapeutic Drug Monitoring*, 2006. – Vol. 28(5). – P. 673–7.

58. Bank P. GenoChip CYP2D6 macroarray as a method to genotype for CYP2D6 variants: results of a validation study in a Caucasian population / J. Swen, H. Guchelaar, T. van der Straaten. – *Pharmacogenomics*, 2015. – Vol. 16(7). – P. 681–7.

59. Shad M. Genetic Testing for Antipsychotic Pharmacotherapy: Bench to Bedside. – *Behavioral sciences (Basel, Switzerland)*, 2021. – Vol. 11(7). – 97 p.

60. Encountering Pharmacogenetic Test Results in the Psychiatric Clinic / C. Bousman [et al.]. – *Canadian Journal of Psychiatry*, 2022. – Vol. 67(2). – P. 95–100.

61. van der Lee M. Technologies for Pharma-

cogenomics: A Review / M. Kriek, H. Guchelaar, J. Swen. – Genes (Basel), 2020. – Vol. 11(12). – 1 456 p.  
62. Auwerx C. From pharmacogenetics to phar- maco-omics: Milestones and future directions / M. Sadler, A. Reymond, Z. Kutalik. – Human Genetics and Genomics Advances, 2022. – Vol. 3(2). – 100100 p.

I. M. Halayenka<sup>1</sup>, V. G. Obyedkov<sup>2</sup>, T. S. Golubeva<sup>2</sup>, T. V. Dokukina<sup>2</sup>, A. V. Hodzhaev<sup>2</sup>

## RELEVANCE OF PHARMACOGENETIC TESTING IN THE ANTIPSYCHOTIC THERAPY OF SCHIZOPHRENIA

<sup>1</sup>State Scientific Institution

“Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus”

27 Akademicheskaya St., 220072 Minsk, the Republic of Belarus

e-mail: goloenkoi@tut.by

<sup>2</sup>State Institution

“Republican Scientific and Practical Center for Mental Health”

152 Dolginovsky trakt, 220080 Minsk, the Republic of Belarus

A personalized approach requires taking into account the pharmacogenetic characteristics of patients to choose antipsychotic therapy. Genetic factors can play a decisive role in the success of schizophrenia therapy if there is a hereditary violation of the pharmacokinetic and pharmacodynamic processes of biotransformation and the effects of antipsychotic drugs. The *CYP2D6* pharmacogen is one of the most important factors affecting the metabolic status of a patient with prolonged use of neuroleptics. According to numerous studies, in patients with slow and fast metabolism, the choice of antipsychotic therapy based on genetic tests for the *CYP2D6* gene reduces the risk of side effects, withdrawal of therapy and its ineffectiveness. The introduction of pharmacogenetic testing algorithms into routine clinical practice is hampered by the limited possibilities of choosing reliable genetic markers, prompt genetic testing, and interactive transmission of results for clinical use. Convenient algorithms are needed for the interaction of geneticists and clinicians. The article considers the genetic factors of the response to antipsychotic therapy, summarizes the data presented in the literature on the use of genetic testing in the appointment of antipsychotics, indicates the existing information databases, justifies the introduction of genetic testing into the algorithm for the treatment of schizophrenia.

**Keywords:** pharmacogenetics, pharmacogenomics, schizophrenia, gene polymorphism, cytochrome CYP2D6, pharmacogenetic testing.

*Дата поступления статьи: 05 сентября 2022 г.*

## ПРОФЕССИЯ — УЧЁНЫЙ (К ЮБИЛЕЮ АКАДЕМИКА Л. В. ХОТЫЛЁВОЙ)

*12 марта исполнилось 95 лет выдающемуся белорусскому ученому в области генетики, доктору биологических наук, профессору, академику НАН Беларуси, заслуженному деятелю науки Любови Владимировне Хотылёвой.*



Любовь Владимировна родилась в г. Гомеле, среднюю школу окончила в эвакуации в н.п. Кинель Куйбышевской области. В 1944 г. она поступила в Куйбышевский сельскохозяйственный институт, с 1946 г. продолжила обучение в Сельско-

хозяйственном институте (в настоящее время — Белорусской государственной ордена Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственной академии), после окончания которого поступила в аспирантуру на кафедру генетики Московского государственного университета, где в 1953 г. успешно защитила кандидатскую диссертацию по генетике и селекции кукурузы. Весь дальнейший жизненный путь Любови Владимировны неразрывно связан со становлением и развитием генетических исследований в НАН Беларуси. В 1955 г. она поступила на работу в Отдел генетики Института биологии АН БССР, позднее преобразованный в Институт генетики и цитологии АН БССР. Активно занимаясь исследованием фундаментальных и прикладных проблем гетерозиса и генетики количественных признаков, в короткое время Любовь Владимировна добилась прорывных результатов, которые были высоко оценены мировым научным сообществом и принесли ИГЦ славу признанного центра по данному направлению. Полученные научные результаты были обобщены в ее докторской диссертации «Принципы и методы селекции на комбинационную способность» (1966 г.), а в 1984-м за разработку проблем гетерозиса Любовь Вла-

димировна вместе с другими сотрудниками института была удостоена Государственной премии БССР в области науки и техники. Признанием научно-организационной деятельности учёного становится её избрание в 1972 г. членом-корреспондентом, в 1980 г. — академиком АН БССР.

Одним из основных направлений ее научных исследований является изучение влияния внешней среды на проявление хозяйственно важных признаков у сельскохозяйственных растений. За разработку принципов и методов экологической селекции растений Любовь Владимировна в соавторстве с академиком А. В. Кильчевским стала лауреатом Премии НАН Беларуси (1999 г.). Коллективом авторов под руководством Любови Владимировны проведены работы по использованию культуры клеток и тканей растений в генетических исследованиях и селекции, созданию новых форм тритикале с интрогрессией чужеродного генетического материала, получившие высокую оценку научной общественности и международное признание. В 2007 г. научные труды по реорганизации ядерного генома злаков методами биотехнологии, выполненные белорусско-российским коллективом ученых под руководством Любови Владимировны, отмечены Премией имени академика В. А. Коптюга. Особенностью данных исследований явилось умелое сочетание традиционных методов (отдаленной гибридизации и генетического анализа) с новейшими методами хромосомной и геномной инженерии, культивирования клеток и тканей, молекулярно-генетического картирования.

В настоящее время под руководством Любови Владимировны продолжают работы по изучению генетических основ формирования продуктивности и признаков качества сельскохозяйственных растений с использованием современных молекулярно-генетических и биохимических подходов, генетическому

анализу действия генов при гетерозисе, внутривидовой, межвидовой и отдаленной гибридизации. За особые заслуги в сохранении Вавиловской коллекции мировых генетических ресурсов растений для настоящего и будущих поколений в 2022 г. она награждена почетным знаком «Медаль академика Н. И. Вавилова».

Исследования академика Любови Владимировны Хотылёвой всегда были тесно связаны с нуждами селекции и сельскохозяйственно-го производства. Она является одним из авторов высокопродуктивного сорта тритикале «Немига 2». При ее участии созданы восемь гибридов томатов, двенадцать сортов перца сладкого, четыре гибрида капусты и сорт перца горького. Научное наследие юбиляра находит отражение в более 900 научных работах, в том числе 30 монографий. Она обладатель 33 авторских свидетельств на сорта и изобретения, девяти патентов. Любовь Владимировна умеет и любит работать в коллективе: под ее руководством создана научная школа и выросла достойная смена ученых, насчитывающая 6 докторов и 46 кандидатов наук.

Организаторский талант Любовь Владимировны многогранно раскрылся в 1971 г., когда она возглавила Институт генетики и цитологии. За 24 года руководства ей удалось обеспечить поддержку уже сложившимся научным школам, дать начало новым направлениям исследований, сформировать коллектив молодых ученых, модернизировать материально-техническую базу. Под ее руководством институт занял лидирующие позиции в стране в области генетики и вошел в тройку ведущих генетических институтов на постсоветском пространстве, за что Любовь Владимировна удостоена звания «Почетный директор».

Помимо научной работы в институте, Любовь Владимировна уделяла большое внимание организации всей биологической науки в стране. В 1992 г. она избирается академиком-секретарем Отделения биологических наук АН Беларуси, затем с 1997–2002 гг. — советником Президиума НАН Беларуси. Многие годы она плодотворно работала в составе Президиума ВАК СССР и ВАК Беларуси, являлась заместителем Председателя и руководителем секции биологических наук БРФФИ, возглавляла Белорусское общество генетиков и селекционеров. Сегодня Любовь Владимировна

входит в состав редколлегий многих ведущих научных журналов, научных и экспертных советов. В настоящее время под руководством Любови Хотылёвой продолжают работы по изучению генетических основ формирования продуктивности и признаков качества сельскохозяйственных растений с использованием современных молекулярно-генетических и биохимических подходов, генетическому анализу действия генов при гетерозисе, внутривидовой, межвидовой и отдаленной гибридизации. За особые заслуги в сохранении Вавиловской коллекции мировых генетических ресурсов растений для настоящего и будущих поколений в 2022 г. она награждена почетным знаком «Медаль академика Н. И. Вавилова».

Любовь Владимировна — яркий ученый, мудрый наставник и опытный руководитель. За значительные научные заслуги и высокий профессионализм она отмечена многими правительственными наградами — орденами Ленина, Трудового Красного Знамени, Франциска Скорины, медалью «За доблестный труд в ознаменование 100-летия со дня рождения В. И. Ленина», Золотой медалью НАН Беларуси и множеством других. За большой вклад в развитие белорусской науки она удостоена высокого звания «Заслуженный деятель науки БССР» и Благодарности Президента Республики Беларусь.

*Отделение биологических наук, коллектив Института генетики и цитологии, ученики и коллеги сердечно поздравляют Любовь Владимировну с замечательным юбилеем и выражают свою признательность, глубочайшее уважение и почтение за самоотверженный труд, талант и мастерство, за верность высокому призванию, внимательное и чуткое отношение к людям. От всей души желаем крепкого здоровья, физического и творческого долголетия, тепла и заботы близких и новых свершений на благо генетической науки!*

*А. В. Кильчевский, Р. И. Шейко,  
О. Ю. Баранов, В. А. Лемеш*



У входа в биологический корпус. Слева направо: директор Института экспериментальной ботаники В. И. Парфёнов, директор Института зоологии Л. М. Сушеня, директор Института генетики и цитологии Л. В. Хотылёва, директор Института фотобиологии А. А. Шлык. Минск, 1980 г.



Л. В. Хотылёва и Н. В. Турбин на производственных посевах районированного в Киргизии белорусского сорта тритикале Немига 2. Киргизия, 1984 г.



Подготовка на телестудии передачи о лауреатах Государственной премии в области науки и техники за разработку проблем гетерозиса. Минск, 1984 г.



Выступление на семинаре в сельскохозяйственном колледже. Япония, 1985 г.



На I Международной конференции по анеупloidии пшеницы. Слева направо: Ху Даофень, Е. Р. Сирс — автор первой анеупloidной серии моносомных линий пшеницы, Л. В. Хотылёва. Китай, 1986 г.



Л. В. Хотылёва с академиками НАН Беларуси В. И. Парфёновым и И. Д. Волотовским. Минск, 1988 г.



На Международной конференции, посвященной памяти академика Н. И. Вавилова. Третий слева академик И. Д. Мустафаев, в центре академик Ю. С. Насыров, Л. В. Хотылёва и член-корреспондент НАН Беларуси М. Т. Чайка. Душанбе, 1988 г.



С председателем исполнительного комитета XVII Международного генетического конгресса сэром Р. Райли. Бирмингем, 1993 г.



Члены Президиума Национальной академии наук Беларуси. В первом ряду слева направо: академики Н. А. Борисевич, Л. В. Хотылёва, Л. М. Сушеня, Р. Г. Горецкий, П. И. Ящерицин; во втором ряду слева направо: А. М. Гончаренко, И. И. Лиштван, В. С. Бураков, М. С. Высоцкий, В. Н. Гурин, И. Я. Науменко. Минск, 1997 г.



Члены бюро Отделения биологических наук НАН Беларуси. В первом ряду слева направо: Е. И. Слобожанина, Л. В. Хотылёва, Л. М. Сушеня, Н. И. Астапович; во втором ряду слева направо: Н. А. Ламан, Н. И. Смеян, В. А. Зинченко, В. И. Парфёнов, В. А. Войнило, А. Г. Лобанок, М. М. Пикулик, О. Г. Давыденко, И. Д. Волотовский, Н. А. Картель. Минск, 1999 г.



Президиум Государственного Высшего аттестационного комитета Республики Беларусь. В первом ряду слева направо: В. Ф. Сорока, Л. В. Хотылёва, Н. И. Юрчук, А. И. Лесникович, В. В. Кукреш; во втором ряду слева направо: И. И. Басецкий, В. И. Пархоменко, О. Г. Слука, А. П. Достанко, А. Н. Морозевич, Н. М. Олехнович, В. А. Шарунов. Минск, 2001 г.



Л. В. Хотылёва (в центре) с сотрудниками лаборатории гетерозиса и генетики количественных признаков Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Минск, 2005 г.



Участники Международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». Слева направо: академик РАН С. Г. Инге-Вецтомов, Л. В. Хотылёва, академик НАН Беларуси Н. А. Картель, член-корреспондент НАН Беларуси Г. Г. Гончаренко. Минск, 2005 г.



I Жебраковские чтения. Слева направо: академик РАН С. Г. Инге-Вецтомов, академики НАН Беларуси Н. А. Ламан и Л. В. Хотылёва, член-корреспондент НАН Беларуси А. В. Кильчевский, доктор биологических наук В. В. Титок. Минск, 2007 г.



Слева направо: академик Н. А. Картель, член-корреспондент А. В. Кильчевский, академик Л. В. Хотылёва. Минск, 2008 г.



Юбилей академика Л. В. Хотылёвой. Слева направо: член-корреспондент М. В. Мясникович, академики Л. В. Хотылёва, И. Д. Вологовский, член-корреспондент А. В. Кильчевский. Минск, 2008 г.



Торжественное заседание посвященное 50-летию со дня основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Минск, 2015 г.



II Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (к 50-летию основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси). Слева направо: академики Н. А. Ламан, Л. В. Хотылёва, С. И. Гриб, д.б.н. И. А. Гордей. Минск, 2015 г.

## ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ ПО ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Редакция сборника научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика» принимает к рассмотрению обзорные статьи и экспериментальные статьи по результатам исследований, выполненных с использованием современных методов в области молекулярной и прикладной генетики, отражающие изучение фундаментальных генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется актуальным проблемам биоинформатики и системной биологии, биоинженерии, вопросам сохранения и рационального использования генетических ресурсов, а также исследованиям, основанным на междисциплинарном подходе.

Статьи публикуются на русском, белорусском и английском языках.

Сборник входит в Перечень научных изданий, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертационных работ (для биологических, медицинских (медико-биологические аспекты), сельскохозяйственных наук), и реферируется и индексируется в РИНЦ (Российский индекс научного цитирования).

Решение о публикации принимается редакционной коллегией после рецензирования, учитывая научную значимость и актуальность представленных материалов.

### ДЛЯ ОПУБЛИКОВАНИЯ РАССМАТРИВАЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ТИПЫ СТАТЕЙ

#### Экспериментальная статья

Основной тип статей, размещаемых в сборнике. Этот формат предназначен для публикации полученных авторами новых данных, представляющих существенный интерес для научного сообщества. Объем экспериментальной статьи не должен превышать 12 страниц. В список использованных источников следует включать не более 30 источников.

#### Обзорная статья

Авторы могут предложить для публикации обзорную статью по теме, представляющей интерес для широкого круга читателей. Объем обзорной статьи не должен превышать 15 страниц. В список использованных источников следует включать не более 50 источников.

#### Краткое сообщение

В исключительных случаях по решению редколлегии в сборнике публикуются краткие сообщения объемом не более 5 страниц, список литературы в этом случае не должен включать более 15 источников.

### СТРУКТУРА СТАТЬИ

Статья набирается в текстовом редакторе Microsoft Word. Поля: верхнее и нижнее — 2 см, левое — 3 см, правое — 1,5 см. Текст набирается шрифтом Times New Roman, 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Выравнивание — по ширине. Абзацный отступ — 1,25 см. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца. Автоматическая расстановка переносов обязательна. Все страницы должны быть пронумерованы. Для создания формул следует использовать только **MathType**.

#### 1. УДК

Располагается в верхнем левом углу страницы.

#### 2. Инициалы и фамилии авторов

Располагаются по центру, выделяются полужирным начертанием. Между инициалами и перед фамилией ставятся неразрывные пробелы (Ctrl + Shift + пробел) (**И. И. Иванов**).

### 3. Название статьи

Располагается по центру, набирается **ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ** полужирным начертанием. Переносы в заголовках не допускаются.

Название статьи должно четко отражать суть работы, не содержать лишних слов. По возможности следует избегать узкой региональности, а данные о географии исследования давать в резюме.

### 4. Место работы авторов с почтовым адресом

Место работы авторов (аббревиатура не допускается) располагается по центру, набирается прямым начертанием. На следующей строке указывается почтовый адрес учреждения (страна, индекс, город, улица, дом).

Если авторы работают в разных учреждениях, то после каждой фамилии и перед соответствующим местом работы надстрочными знаками проставляется цифровой индекс (1, 2 и т. д.).

### 5. Авторское резюме (аннотация)

Располагается после места работы авторов, набирается прямым начертанием.

Авторское резюме должно полно и понятно излагать основное содержание и результаты проведенного исследования. Если из названия статьи очевидны предмет, тема, цель, методы исследования, их не следует повторно излагать в резюме. Объем текста аннотации определяется содержанием публикации (объемом сведений, их научной ценностью и/или практическим значением) и должен быть в пределах 800–1000 знаков с пробелами.

### 6. Ключевые слова (5–10 слов)

Перечисляются после слов «Ключевые слова:». В конце ставится точка.

### 7. Основной текст статьи

Экспериментальная статья должна включать следующие разделы: «**Введение**», «**Материалы и методы**», «**Результаты и обсуждение**», «**Заключение**», «**Список использованных источников**». Обзорная статья и краткое сообщение в обязательном порядке должны содержать разделы: «**Введение**», «**Заключение**» и «**Список использованных источников**». Название остальных разделов выбирается на усмотрение авторов.

Названия разделов располагаются на отдельной строке по центру и выделяются полужирным начертанием.

Изложение статьи должно быть ясным, сжатым, без длинных исторических введений и повторений.

Помимо общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, ДНК), допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте. Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте при их первом упоминании.

Вставка в текст символов (например,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ) производится только через опцию Вставка/Символ.

Для набора надстрочных и подстрочных символов ( $C^2$ ,  $C_4$ ) использовать меню *Шрифт/Надстрочный знак/Подстрочный знак*.

#### *Общие правила набора текста*

Прямое начертание должны иметь:

- 1) греческие символы ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\phi$ ,  $\lambda$  и др.) и знаки ( $\%$ ,  $\leq$ ,  $\pm$ ,  $\times$ ,  $\neq$ ,  $\infty$ ,  $\rightarrow$ ,  $^\circ$ ,  $\notin$  и др.);
- 2) единицы измерения (Вт, В, Дж, кг, м и пр.);
- 3) кириллические (т. е. русские) буквы (П, Л, Ц);
- 4) сокращения от русских или белорусских слов ( $q_{св}$ );
- 5) обозначения химических элементов и соединений (Р,  $H_2O$ );
- 6) названия белков;
- 7) скобки ( ) и запятые ( , ) в формулах и после них ( $x^2 - 0,5b(1,5 + ca)$ ).

*Курсивное* начертание должны иметь названия генов, латинские (т. е. английские) буквы, обозначающие переменные ( $K$ ,  $y$ ,  $z$ ,  $x$ ,  $V$ ,  $i$ ,  $j$ ), латинские названия семейств, родовые и видовые названия.

Без пробелов следует проставлять:

- 1) дефис (-) в сложных словах (минерал-индикатор, К-пространство) и при наращении падежных окончаний к цифрам и буквам (1-го, j-го);
- 2) короткое тире (—) (Ctrl + «←» на нумерационной клавиатуре) между цифрами, обозначающими пределы какой-либо величины (20–30 чел.);
- 3) знаки -, +, ≤, > в значении положительной или отрицательной величины, степени увеличения или уменьшения;
- 4) знак %;
- 5) скобки () и кавычки «» от заключенных в них слов (по всей работе кавычки должны быть одного рисунка — «елочки»).

С пробелами проставлять:

- 1) тире (—) (Ctrl + Alt + «←» на нумерационной клавиатуре) с обеих сторон пробелом как знак препинания между словами.
- 2) математические знаки (–, +, ≤, ±, ·, ×, =, ≠ и др.) в формулах, уравнениях, когда они являются знаками арифметического действия ( $R_1 + R_2 = 0,75$ );
- 3) знаки №, § от следующих за ними чисел (№ 4);
- 4) многозначные целые числа, содержащие 5 и более знаков, разбиваются по 3 цифры справа налево (40 450, 8 345 458);
- 5) сокращенные слова от имен собственных, к которым они относятся (ул. Академическая);
- 6) цифры от полных или сокращенных наименований (100 м, 2005 г.).

#### *Требования к рисункам*

Растровые изображения должны иметь разрешение не менее 300 dpi для полутонных изображений (фотографии, газетные вырезки, книжные иллюстрации) и не менее 600 dpi для штриховых изображений (графики, таблицы, детали, выполненные чертежными инструментами). Повышение разрешения после сканирования программными средствами недопустимо.

Рисунки должны размещаться только после их упоминания в тексте статьи. Если ссылка на рисунок включена в предложение, используется полное написание — «рисунок 1»; если слова заключаются в скобки, используется сокращение — (рис. 1).

Слово **Рис. 1.** и подрисовочная подпись располагаются на следующей строке после самого рисунка (**Рис. 1.** Название). Точка после названия не ставится.

Рисунки должны быть представлены в электронном виде отдельными файлами в следующих форматах: JPEG, TIFF, PNG. Название файла должно соответствовать номеру рисунка (Рис. 1, Рис. 2 и т. д.). Для отправки все файлы рисунков объединяются в одну архивную папку zip или rar. Не допускается размещение рисунков в конце статьи (перед списком литературы).

#### *Оформление таблиц*

Таблицы должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора Microsoft Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах.

Таблицы должны быть пронумерованы и иметь названия, размещаться только после их упоминания в тексте статьи. Если ссылка на таблицу включена в предложение, используется полное написание — «таблица 1»; если слова заключаются в скобки, используется сокращение — (табл. 1).

Слово **Таблица 1** выравнивается по правому краю и выделяется полужирным начертанием.

На следующей строке за словом **Таблица 1** следует название таблицы, которое набирается прямым начертанием и выравнивается по центру (без абзацного отступа).

Примечание к таблице располагается на следующей строке после таблицы. Слово **Примечание** выделяется полужирным начертанием, после него ставится точка. Текст примечания следует за словом **Примечание** и начинается с прописной буквы. Точка после текста примечания не ставится. Четко указывается размерность показателей. Цифры в таблицах должны соответствовать своему упоминанию в тексте статьи.

Не допускается размещение таблиц в конце статьи (перед списком литературы).

#### *Информация о соблюдении требований Нагойского протокола*

Если работа связана с исследованиями, в которых в качестве объекта используются генетические ресурсы (растения, животные, микроорганизмы), полученные от зарубежных партнеров, необ-

ходимо дать ссылку на Международно признанный сертификат о соблюдении (Internationally Recognized Certificate of Compliance) Нагойского протокола к Конвенции о биологическом разнообразии, подтверждающий легальное получение данных ресурсов.

#### *Информация о соблюдении биоэтических стандартов*

Если работа связана с исследованиями, в которых в качестве объекта используются лабораторные животные, то необходимо указать, соблюдались ли международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных.

Если в качестве объектов исследования выступает человек, то необходимо указать:

- соответствуют ли процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики;
- получено ли от каждого из включенных в исследование участников информированное добровольное согласие.

#### *В конце статьи по желанию авторов приводится следующая справочная информация:*

Общая информация о помощи в проведении работы и подготовке статьи: сообщения о предоставлении материалов, данных, компьютерного обеспечения, приборов во временное пользование; информация о проведении исследований в центрах коллективного пользования; помощь в технической подготовке текста; а также все прочее, что оценивается как полезная помощь. Информация о грантах и другой финансовой поддержке исследований. Авторы не должны использовать сокращенные названия институтов и спонсирующих организаций.

#### **8. Список использованных источников**

Оформляется в соответствии с приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 25 июня 2014 г. № 159. Источники должны быть представлены в виде списка в порядке упоминания ссылок в тексте статьи. Нумерация — автоматическая.

Не допускаются ссылки на работы, которых нет в списке литературы, а также на неопубликованные материалы. В список использованных источников преимущественно следует включать работы не старше 10 лет (исключение составляют редкие высокоинформативные материалы).

#### **9. На английском языке повторяются п. 2–6**

#### **10. Дата поступления статьи**

#### **К статье прилагаются:**

**1. Акт экспертизы** о возможности опубликования в открытой печати.

**2. Сопроводительное письмо**, в структуре которого должны содержаться сведения о том, что:  
– рукопись не находится на рассмотрении в другом издании;  
– не была ранее опубликована.

Авторы несут ответственность за достоверность представленных в рукописи материалов.

**3. Краткие сведения о каждом из авторов**, включающие ФИО (полностью), год рождения, служебный адрес, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность. Сведения об авторах предоставляются отдельным документом.

Бумажный экземпляр статьи подписывается всеми авторами.

Статья (в двух экземплярах) и сопроводительные документы представляются лично либо по почте на адрес: ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь. Электронная копия материалов направляется на электронный адрес: [redactor@igc.by](mailto:redactor@igc.by).

Редакция оставляет за собой право в процессе редакционной подготовки сокращать и исправлять рукопись по согласованию с автором.





Научное издание

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 34

Ответственный за выпуск *Е. М. Селихова*  
Переводчик *М. Г. Пыжова*

Подписано в печать 14.04.2023 г. Формат 60×84<sup>1/8</sup>. Бумага офсетная. Гарнитура Times.  
Печать цифровая. Усл. печ. л. 17,21. Уч.-изд. л. 11,56. Тираж 80 экз. Заказ № 192.

Отпечатано на государственном предприятии «СтройМедиаПроект»  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 2/42 от 13.02.2014.  
220123, г. Минск, ул. В. Хоружей, 13/61

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.