

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 17**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2014

УДК [577.21 + 575] (082)

Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», 2014. – Т. 17. – 120 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. Хотылева – зам. главного редактора;
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.П. Ермишин,
Н.В. Павлючук, Н.В. Казаровец, А.И. Ковалевич, Г.И. Лазюк,
В.А. Лемеш, С.А. Лихачев, Н.П. Максимова, С.Б. Мельнов, М.Е. Михайлова,
И.Б. Моссэ, М.Е. Никифоров, В.Е. Падутов, В.Н. Решетников, Е.А. Сычева,
В.В. Титок, И.П. Шейко, О.Н. Харкевич – члены редколлегии;
И.В. Широкая – ответственный секретарь.

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

ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси», 2014

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский, О.Ю. Урбанович</i> Научное наследие академика НАН Беларуси Картеля Николая Александровича	7
<i>О.П. Романюк, Н.И. Рябоконь, Н.В. Никитченко, Е.В. Сечко, А.М. Чичко, А.В. Сукало, Р.И. Гончарова</i> Полиморфные варианты генов <i>TNFA</i> -308 G→A, <i>XPDAsp312Asn</i> и <i>XRCCI Arg399Gln</i> у детей с ювенильным ревматоидным артритом.....	12
<i>Н.В. Полякова, Г.В. Семейко, Е.О. Самойлович</i> Генотипический пейзаж ротавирусов – этиологических агентов острых гастроэнтеритов у детей в г. Минске в 2012–2013 гг.	19
<i>Н.П. Митьковская, Т.В. Статкевич, С.С. Галицкая, Е.М. Балыш, А.С. Постоялко, Е.С. Смирнова, А.А. Гусина, Е.А. Сулимчик</i> Влияние генетических полиморфизмов <i>ABCB1</i> и <i>CYP2C19</i> на развитие рецидивирующих коронарных событий у пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам	25
<i>Н.П. Митьковская, Т.В. Статкевич, Е.М. Балыш, А.А. Гусина, И.В. Патенюк, Л.В. Картун, Е.А. Сулимчик</i> Распространенность полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы (<i>C677T</i>) у пациентов с крупноочаговым инфарктом миокарда и рецидивирующими коронарными событиями	31
<i>И.В. Городецкая, О.В. Евдокимова</i> Влияние тиреоидного статуса на вызванное стрессом изменение экспрессии генов раннего ответа <i>c-fos</i> и <i>c-jun</i> в миокарде крыс	38
<i>В.В. Слизень, Ж.Ф. Циркунова, Е.И. Гудкова, О.Ч. Глаз</i> Идентификация <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>Typhimurium</i> методом ПЦР	48
<i>Е.А. Фомина, С.Н. Куликович, С.В. Малышев, О.Ю. Урбанович</i> Распространение 1BL.1RS транслокации в коллекции сортов и линий озимой пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.)	54
<i>Е.В. Воронкова, В.И. Лукиш, О.Н. Гукасян, А.Г. Жуковский, С.Ф. Буга, Е.А. Волуевич</i> Использование ПЦР-ПДРФ метода для диагностики мутации G143A устойчивости к стробилуринам в изолятах возбудителя септориоза листьев пшеницы	62
<i>С.И. Вакула, Н.В. Анисимова, В.Н. Леонтьев, В.В. Титок, А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева</i> Изменчивость накопления запасных соединений фосфора в семенах льна масличного	71

Е.А. Волуевич

Остаточный эффект преодоленных генов устойчивости мягкой пшеницы к биотрофным грибным патогенам..... 78

О.А. Орловская, А.Н. Иванистов, К.Р. Кем

Оценка гибридов F₄ озимого тритикале, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения, по основным хозяйственно ценным признакам..... 85

М.Е. Михайлова, Е.Л. Романишко

Определение полиморфизма гена эстрогенового рецептора *ESR1-PvuII*, маркера плодовитости свиней, с помощью HRM-анализа..... 91

Р.А. Кулибаба

Полиморфизм генов семейства трансформирующих ростовых факторов-бета в линиях кур украинской селекции..... 97

А.П. Ермишин

Некоторые методические вопросы детекции и количественного определения генетически модифицированных составляющих в продуктах питания..... 104

Рефераты..... 110

Правила оформления статьи..... 118

CONTENTS

<i>L. Khotyleva, A. Kilcheuski, O. Urbanovich</i> Scientific Heritage of Nikolai A. Kartel, Academician of the National Academy of Sciences of Belarus.....	7
<i>V. Ramaniuk, N. Ryabokon, N. Nikitchenko, E. Sechko, A. Chichko, A. Sukalo, R. Goncharova</i> <i>TNFα</i> -308 G→A, <i>XPD</i> Asp312Asn and <i>XRCC1</i> Arg399Gln gene polymorphisms in children with juvenile rheumatoid arthritis.....	12
<i>N. Poliakova, G. Semeiko, E. Samoilovich</i> Genotypic landscape of rotaviruses – etiologial agents of acute gastroenterites among children in Minsk in 2012–2013.....	19
<i>N. Mitkovskaya, T. Statkevich, S. Galitskya, E. Balysh, A. Postoyalko, E. Smirnova, A. Gusina, E. Sulimchik</i> The influence of <i>ABCB1</i> and <i>CYP2C19</i> genetic polymorphisms on the development of recurrent coronary events in patients with ST-segment elevation acute coronary syndrome who underwent percutaneous coronary interventions	25
<i>N. Mitkovskaya, T. Statkevich, E. Balysh, A. Gusina, I. Pateyuk, L. Kartun, E. Sulimchik</i> Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C→T polymorphism in patients with macrofocal myocardial infarction and recurrent coronary events.....	31
<i>I. Gorodetskaya, O. Evdokimova</i> The influence of thyroid status on stress-induced changes in the expression of early response genes <i>c-fos</i> and <i>c-jun</i> in rat myocardium.....	38
<i>V. Slizen, Zh. Tsyrukunova, E. Gudkova, O. Glaz</i> PCR-Identification of <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	48
<i>E. Fomina, S. Kulinkovich, S. Malyshev, O. Urbanovich</i> Distribution of the 1BL.1RS translocation in the collection of winter wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) cultivars and lines	54
<i>E. Voronkova, V. Luksha, O. Gukasian, A. Zhukovski, S. Buga, E. Voluevitch</i> The PCR-RFLP method application for identification of strobilurin resistance G143A mutation in isolates of septoria leaf blotch pathogen	62
<i>S. Vakula, N. Anisimova, V. Leontiev, V. Titok, A. Kilcheuski, L. Khotyleva</i> Accumulation variability of reserve phosphorus compounds in linseed.....	71
<i>E. Voluevich</i> Residual effect of defeated resistance genes of common wheat to biotrophic fungal pathogens.....	78

O. Orlovskaya, A. Ivanistov, K. Kem

Evaluation of main agronomic traits of winter triticales F₄ hybrids, produced by crossing accessions of different ecological and geographic origin 85

M. Mikhailova, E. Ramanishka

Detection of estrogen receptor gene *ESR1-PvuII* polymorphism, marker of pig fertility, using HRM-analysis 91

R. Kulibaba

Polymorphism of transforming growth beta-factor family genes in the chicken line of Ukrainian breeding. 97

A. Yermishin

Some technical aspects of detection and quantification of genetically modified components in food..... 104

Summaries 110

Instructions to authors 118

НАУЧНОЕ НАСЛЕДИЕ АКАДЕМИКА НАН БЕЛАРУСИ КАРТЕЛЯ НИКОЛАЯ АЛЕКСАНДРОВИЧА

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

1 апреля 2013 г. на 76-м году жизни скончался известный белорусский ученый, академик НАН Беларуси, профессор, доктор биологических наук Николай Александрович Картель, внесший большой вклад в становление и развитие молекулярно-генетических исследований в Беларуси.

Научная карьера Н.А. Картеля началась в Белорусском лесотехническом институте им. С.М. Кирова (ныне Белорусский государственный технологический университет). Его первые научные работы, опубликованные в 60-е годы XX столетия, посвящены генетике и цитогенетике лесных пород.

С 1968 года научные исследования Н.А. Картеля связаны с Институтом генетики и цитологии НАН Беларуси, в который он пришел работать по приглашению академика Н.В. Турбина после возвращения из Швеции, где прошел стажировку под руководством известного генетика, профессора А. Густафссона. В первые годы работы Николай Александрович активно изучает проблему радиационного мутагенеза у сельскохозяйственных растений и публикует серию научных работ, в которых приводит результаты исследований о влиянии различных доз радиации на сорта ячменя, оценке их мутагенного эффекта и критериев радиочувствительности тканей растений.

С середины 70-х годов Н.А. Картель увлекается вопросами молекулярной генетики, которая в то время начала активно развиваться в мире. По инициативе академика Н.В. Турбина, сначала совместно с Институтом прикладной молекулярной биологии и генетики ВАСХНИЛ, а затем самостоятельно, Николай Александрович разрабатывает проблему генетической трансформации у растений, выполняя оригинальные эксперименты по введению экзогенной ДНК в клетки растений ячменя. Им, совместно с сотрудниками, отрабатываются методы получения высокоочищенной

ДНК из растительного материала, методы эффективного введения тотальных препаратов ДНК в различные органы и клетки растения, изучаются факторы, повышающие эффективность включения ДНК в клетки и ядра растений. В процессе исследований были выявлены физиологические и цитологические эффекты влияния экзогенной ДНК на реципиентные растения. Показано, что экзогенная ДНК способна индуцировать наследственные изменения у злаков, частота, характер проявления и наследование которых отличаются от типичных мутаций. Были получены формы ярового ячменя, характеризующиеся рядом новых признаков по сравнению с исходными образцами. Это были пионерские исследования не только для нашей страны, но и для всего мира. Результаты работы были опубликованы в крупных международных научных журналах и монографии «Эффекты экзогенной ДНК у высших растений» (1981 г.), а также легли в основу докторской диссертации Николая Александровича, успешно защищенной в 1984 г.

В 70-х годах прошлого столетия большое внимание стали уделять агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*, которая способна инфицировать двудольные растения и индуцировать у них генетическую трансформацию с образованием корончатых галлов. В процессе исследований онкогенных свойств бактерий *A. tumefaciens*, выполненных группой сотрудников Н.А. Картеля было выявлено, что на онкогенность *A. tumefaciens* оказывают супрессирующее действие плазмиды *psa* и *R388*, присутствие которых приводит к снижению синтеза индолуксусной кислоты у бактерий. Молекулярно-генетический анализ штаммов бактерий, характеризующихся высоким уровнем синтеза ИУК, позволил сделать вывод, что фитопатогенные бактерии синтезируют ИУК преимущественно через индоллил-3-ацетамид и ген *iaaM*, кодирующий ключевой фермент этого пути триптофан-

2-монооксигеназу. Было установлено, что свойство плазмиды R388 супрессировать функцию генов, связанных с контролем синтеза ИУК у *A. tumefaciens*, распространяется на ИУК-синтезирующие бактерии других родов. Была показана возможность трансформации протопластов табака штаммами *A. tumefaciens*, содержащими антионкогенные R-плазмиды pSa и R388. В то же время эти трансконъюганты не были способны индуцировать опухолеобразование на интактных растениях каланхое, что свидетельствовало о важной роли фитогормона ИУК на первом этапе взаимодействия клеток агробактерий с клетками растений. Были получены новые данные о роли ИУК в фитопатогенности бактерий, а также во взаимодействии агробактерий с клетками растений. Показано, что ИУК-продуцирующая способность является свойством, присущим широкому ряду бактерий, независимо от их таксономической принадлежности и характера взаимодействия с растениями. Эти данные внесли вклад в понимание и разработку методов биологического контроля болезней растений, связанных с фитогормональной активностью обитающих в ризосфере бактерий.

Работы по молекулярной генетике микроорганизмов позже были продолжены в другом направлении. Совместно с лабораторией биотехнологии соединений нуклеиновой природы Института микробиологии НАН Беларуси из штамма *E. coli* был выделен ген пуридинуклеозидфосфорилазы и созданы векторы экспрессии нуклеозидфосфорилаз (пуридинуклеозидфосфорилаза, уридинфосфорилаза и тимидинфосфорилаза). Выделены штаммы-сверхпродуценты на основе штамма *E. coli* BL21 с активностью целевых ферментов, в 20–30 раз превышающей активность ферментов, традиционно используемых штаммов *E. coli*. Разработаны и оформлены технологические инструкции по получению препаратов рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз. Результаты исследований применяются в технологии производства флуаробела, гуарана и рибаверина – высокоэффективных противолейкозных и противовирусных препаратов последнего поколения.

С 1979 по 1994 гг. Николай Александрович Картель занимает должность заместителя директора по научной работе Института гене-

тики и цитологии НАН Беларуси, а с 1994 по 2004 гг. является его директором. В течение этого времени Н.А. Картель наиболее успешно реализует свой научный потенциал

В 1985 году Н.А. Картель возглавил лабораторию молекулярной генетики и объединил под своим руководством коллектив молодых, инициативных сотрудников, которые начали новые для Беларуси разносторонние исследования в области молекулярной генетики. В середине 80-х годов впервые в нашей стране в этой лаборатории были проведены экспертизы по ДНК-идентификации личности человека и выполнены анализы по установлению отцовства. Работы вызвали огромный интерес криминалистов и позже были переданы в соответствующие структуры МВД. Сотрудничество в этой области продолжалось на протяжении многих лет. Совместно с НИИ проблем криминологии, криминалистики и судебной экспертизы (НИИПККиСЭ) Минюста РБ был разработан новый метод выделения и очистки ДНК из криминалистических объектов, созданы две триплексные тест-системы и наборы реактивов для выделения ДНК и генотипирования, разработаны протоколы использования созданных тест-систем. Данные разработки внедрены в практику производства судебно-генетических экспертиз по постановлениям следствия и судов в НИИПККиСЭ.

В связи с Чернобыльской катастрофой коллектив лаборатории под руководством Н.А. Картеля включился в исследования проблемы воздействия радиации на геном человека. Были изучены молекулярные факторы, влияющие на развитие папиллярных карцином щитовидной железы у белорусских пациентов, прооперированных в 1996–2005 гг., проживающих во время аварии на Чернобыльской АЭС в зоне радиационного облучения. Были обнаружены закономерности в распределении активирующих мутаций генов *Braf* и *c-ret* среди больных и показано, что онкогены Ret/PTC1 отмечены с большей частотой при случаях заболевания, которые наблюдались через 10–15 лет после аварии. Впервые установлено наличие альтернативного сплайсинга транскриптов Ret/PTC при папиллярном раке щитовидной железы. В опухолевых клетках обнаружены различные изоформы Ret/PTC, которые различались доменами на С-концевом участке белка. Выявлены также уникальные формы онкогена Ret/

РТС. Продemonстрирована предрасположенность к развитию папиллярного рака щитовидной железы, связанная с редкими формами аллеля гена *Hras1*.

В середине 80-х годов в лаборатории молекулярной генетики были начаты исследования повторяющихся последовательностей геномов злаков. Впервые установлено присутствие простых повторов AT, CA, GA и GC в геноме ячменя. У растений удалось клонировать и секвенировать последовательность, содержащую AT-повторы и использовать ее в качестве молекулярно-генетического маркера. Позже была продемонстрирована возможность модуляции активности промоторов простыми повторами (AT)*n* и (AC)*n*, а также способность простых повторов частично выполнять функции промотора.

В процессе исследований изучена роль отдельных классов повторяющихся последовательностей ДНК в структуре, организации и функционировании генома растений. Так, изучение диспергированной повторяющейся последовательности из семейства транскрипционно активных повторов в геноме ячменя позволило установить, что эта последовательность является членом нового семейства, на долю которого приходится около 5% генома ячменя и до 1% генома ржи и пшеницы. Члены семейства диспергированы по всем 7 хромосомам ячменя. Их гомологи представлены в геномах видов *Secale*, *Triticum*, *Avena*, *Zea*. Расхождение видов трибы *Triticae* в процессе эволюции сопровождалось изменением структуры данного повтора. Это была первая секвенированная последовательность, зарегистрированная в GenBank от Беларуси. Были клонированы и охарактеризованы диспергированные повторяющиеся последовательности из генома ржи и пшеницы, на долю которых приходится около 0,5% генома.

Сформированная библиотека низкокопийных и уникальных последовательностей ДНК ржи привела в дальнейшем к созданию, совместно с учеными из Санкт-Петербурга (Россия) и Гатерслебена (Германия), ряда насыщенных молекулярными маркерами генетических карт этой культуры. В общей сложности на ней было локализовано 20 генов, кодирующих хозяйственно ценные признаки, и обнаружено 124 локуса, контролирующих количественные признаки.

Впервые совместно с исследователями из Санкт-Петербурга с помощью цитологического анализа метафазы I мейоза были выделены и охарактеризованы мутантные растения у шести гибридных F₂ популяций ржи, расщепляющихся по признаку «нарушение синапса гомологичных хромосом». Показано моногенное наследование по синаптическим мутациям: *sy1*, *sy9*, *sy10*, *sy18*, *sy19*. Построены генетические карты сцепления участков хромосом 2R и 7R ржи, включающие изоферментные локусы, микросателлитные маркеры и гены, ответственные за синапсис хромосом. Создана генетическая AFLP карта генома ржи популяции F₂, расщепляющейся по наличию десинаптической мутации *sy10*, картированной на хромосоме 5R ржи. Впервые для ржи получены двойные мутанты по генам асинапсиса *sy1* и *sy9*.

Разработаны методы ДНК-тестирования хозяйственно ценных генов в геноме пшеницы и других сельскохозяйственных культур. В частности, предложен эффективный метод ДНК-тестирования аллельного состава генов, кодирующих некоторые запасные белки зерновок белорусских сортов пшеницы, и изучен аллельный состав глютенинов, определяющих вязкость и эластичность муки, пуроиндолинов, определяющих твердозерность, а также генов короткостебельности. Выявлены сорта пшеницы, обладающие наилучшим сочетанием аллелей высокомолекулярных глютенинов и твердозерности. Совместно с НПЦ НАН Беларуси по земледелию создано 3 сорта озимой пшеницы.

Разработана система ДНК-идентификации и паспортизации генотипов пшеницы, картофеля, томата, льна, свеклы и других культур. Метод основан на использовании SSR-маркеров, выявленных в результате полимеразной цепной реакции, что позволяет проводить анализ любых органов растений на различных стадиях онтогенеза. Для каждого вида подобран набор высокополиморфных SSR-маркеров, достаточный для идентификации сортов, форм и линий. Представлена система регистрации генотипов в виде генетических формул, которые отображают аллельный состав микросателлитных локусов. Предложенный метод ДНК-паспортизации обеспечивает возможность проверки соответствия сортов критериям ООС-теста (отличимость, однородность и стабильность). Он может быть использован для решения широкого круга задач,

таких как: оценка генотипической однородности сортов, линий или гибридов, соответствия сорта стандарту, для создания компьютерной базы данных ДНК-паспортов, охраняемых в РБ сортов растений.

Особое внимание Николай Александрович уделял созданию генетически модифицированных организмов. Под его руководством проводилась отработка условий регенерации растений в культуре *in vitro*. На модельных и хозяйственно ценных растениях апробировались различные методы трансформации: с помощью транспозонов, путем слияния протопластов, баллистическая, агробактериальная. Параллельно проводились исследования по созданию эффективных векторов для трансформации.

Сотрудники лаборатории одними из первых использовали векторы на основе транспозонов при создании трансгенных растений, также ими была показана возможность получения с их помощью модифицированных растений линий дикого вида картофеля *S. chacoense*. В дальнейшем разработка векторных конструкций разной степени сложности стала неотъемлемым этапом работ по созданию трансгенных растений. В частности, была создана серия рекомбинантных плазмид, содержащих вставки простых повторов (AC)*n* и (AT)*n* в различных областях 35S CaMV промоторов, а также в 3' нетранслируемой области генов *cat* и *bar*. Впервые показано, что эти последовательности способны модифицировать экспрессию генов в протопластах табака и клетках кишечной палочки. Выявлены общие закономерности влияния простых повторов на экспрессию генов, что свидетельствует об универсальности механизмов их действия в геномах, а также позволяет использовать данные повторы для модуляции экспрессии генов в экспериментах по генетической трансформации растений.

Были построены теоретические модели, обосновывающие модификацию нуклеотидных последовательностей гетерологических генов для их экспрессии в растениях. Осуществлены модификации нуклеотидных последовательностей гетерологических генов в соответствии с выбранными теоретическими моделями. Проведен синтез генов *cry3A* и ингибитора протеаз из *S. gregaria* с оптимизированным кодонным составом. Выполнена модификация гена *SD2*, которая заключается в замене части гена на последовательность дефензина из картофеля. Синтезирована форма

гена *CYP11A1*, лишенная последовательности лидерного полипептида. Получены векторные конструкции для трансформации растений модифицированными гетерологическими генами. Создан ряд оригинальных векторных систем, несущих хозяйственно ценные гены рамнолипидов, хитиназы, глюкозооксидазы, цитохрома P450scs и др.

Разработанные векторные конструкции были успешно применены для создания трансгенных растений табака, арабидопсиса, картофеля и др. Так, в ходе исследований, выполненных совместно с английскими учеными, впервые были созданы модельные трансгенные растения табака и арабидопсиса с генами *rhlA* и *rhlB* биосинтеза рамнолипидов. Лабораторные эксперименты показали, что они могут обладать толерантностью к тяжелым металлам.

Проведены эксперименты по трансформации картофеля геном хитиназы. Показано, что система гетерологичной экспрессии гена эндохитиназы *chiA* из гриба *Serratia plymuthica* на основе вектора pGreen и pBI121 в агробактериальных штаммах способна индуцировать трансформацию тетраплоидного картофеля. Интеграция трансгена в геном растений была подтверждена молекулярными методами. В результате были созданы трансгенные растения картофеля на основе белорусского сорта Дельфин. Введение трансгена эндохитиназы *chiA* приводило к синтезу в трансгенных растениях белкового продукта данного гена – функционально активного фермента хитиназы, способствующего подавлению роста фитопатогенных грибов. Были получены количественные данные об уровне ферментативной активности хитиназы в каждой индивидуальной трансгенной линии с использованием различных хитиназа-специфичных субстратов. Показано противогрибное влияние фермента хитиназы в белковых экстрактах трансгенных растений картофеля. Образцы с высокой активностью хитиназы были оценены как перспективные в качестве источника генотипов, способных ингибировать рост и развитие фитопатогенных грибов. Показано, что ген хитиназы может способствовать подавлению роста патогенов – возбудителей *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* и *Alternaria solani* в лабораторных условиях.

Разработаны оригинальные системы гетерологичной экспрессии гена *cry3aM* *Bacillus*

thuringiensis, кодирующего дельта-эндотоксин в растениях картофеля. Целью этих исследований было выявление наиболее эффективной экспрессионной системы для создания растений, устойчивых к колорадскому жуку. Получены и проходят испытание трансгенные растения картофеля, в которых происходит наработка белкового продукта гена *cry3A*М.

Впервые показано, что гетерологичный ген, кодирующий полноразмерную последовательность кДНК *CYP11A1* цитохрома *p450_{scs}* животного происхождения, экспрессируется в растениях. В качестве объектов были выбраны табак и наперстянка. Показано, что в них происходит образование функционально активного белкового продукта. Выявлено, что экспрессия гетерологичного гена *CYP11A1* в трансгенных растениях табака приводит к формированию фенотипа, характеризующегося сокращенным периодом вегетативного развития (раннее цветение и созревание семенных коробочек), увеличенной биомассой и повышенной продуктивностью. Впервые показано, что белковый продукт гена *CYP11A1* животного происхождения интегрируется в стероидогенную систему растений, вызывая изменения в метаболизме стероидных соединений. Установлено, что содержание кардиотонических стероидных гликозидов в листьях трансгенных растений наперстянки двух независимых генетических линий превышает таковое в листьях контрольных растений на 11–16%. Показано, что цитохром *P450_{scs}* млекопитающих способен функционировать в растениях с образованием стероидного гормона – прегненолона. Работы проводились совместно с Институтом общей генетики (г. Москва, Россия). Полученные результаты могут быть положены в основу создания трансгенных растений, в частности, лекарственных, с более высокой продуктивностью биологически активных стероидных соединений.

В результате агробактериальной трансформации получены растения картофеля на основе сорта белорусской селекции Скарб, содержащие ген глюкозооксидазы (*gox*). Факт интеграции и экспрессии гетерологичного гена подтвержден молекулярно-генетическими и биохимическими методами. Показано, что отдельные линии в лабораторных условиях характеризуются устойчивостью к фитофторе.

Большое внимание Николай Александрович уделял вопросам биобезопасности. Под его непосредственным руководством в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси была создана и аккредитована лаборатория по детекции ГМО в пищевых продуктах. Совместно с Республиканским центром гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья была подготовлена инструкция «Молекулярно-генетическая оценка продовольственного сырья, пищевых продуктов и кормов, полученных из генно-инженерных организмов или с их использованием».

Николай Александрович Картель оставил огромное научное наследие. Полученные им результаты опубликованы более чем в 490 научных работах, защищены 4 авторскими свидетельствами и 8 патентами на изобретения. Среди его научных работ 4 монографии, учебник «Биотехнология в растениеводстве» (2005 г.), толковый словарь «Генетика: энциклопедический словарь» (издан в 1999 г., в 2011 г. вышло второе переработанное издание), удостоенный Премии НАН Беларуси. Николаем Александровичем создана научная школа молекулярных генетиков в Беларуси и подготовлены 17 кандидатов наук. Под его руководством проводились совместные исследования с учеными из России, Украины, Израиля, Германии, Великобритании. Его ученики успешно работают в ряде зарубежных стран.

За выдающиеся научные заслуги Николай Александрович в 1986 г. был избран членом-корреспондентом, в 1996 г. – академиком НАН Беларуси. В 1998 году он становится академиком Центрально-Европейской академии науки и искусства, в 1999 г. ему присвоено звание заслуженного деятеля науки Беларуси, с 2006 г. он – академик Международной академии наук Евразии. Н.А. Картель был членом многочисленных научных и экспертных советов, редколлегий ведущих профильных научных журналов. Награжден почетными грамотами и медалями, в т.ч. медалью им. Н.И. Вавилова и медалью Франциска Скорины.

Академик Николай Александрович Картель оставил большое научное наследие. Оно заключается не только в его научных трудах, но и в том влиянии, которое он оказал на развитие отечественной молекулярной генетики.

Дата поступления статьи 18 мая 2014 г.

О.П. Романюк¹, Н.И. Рябоконь¹, Н.В. Никитченко¹, Е.В. Сечко², А.М. Чичко,³ А.В. Сукало³, Р.И. Гончарова¹

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ *TNFA* -308 G→A, *XPB* Asp312Asn И *XRCC1* Arg399Gln У ДЕТЕЙ С ЮВЕНИЛЬНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²УЗ «2-я городская детская клиническая больница»
Республика Беларусь, 220020, г. Минск, ул. Нарочанская, 17

³УО «Белорусский государственный медицинский университет», 1-я кафедра детских болезней
Республика Беларусь, 220020, г. Минск, ул. Нарочанская, 17

Введение

Ювенильный ревматоидный артрит (ЮРА) – системное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу эрозивно-деструктивного артрита [1]. Это заболевание является наиболее распространенной патологией среди воспалительных ревматических заболеваний детского возраста, имеет аутоиммунный характер с хроническим, прогрессирующим течением. У пациентов с ЮРА отмечается уменьшение качества жизни, высокая вероятность ранней инвалидизации [2].

ЮРА встречается со средней частотой 1–4 случая на 1000 детей [3]. Это заболевание может начинаться в любом возрасте. Первый пик дебюта приходится на возраст от 1 до 3 лет, а следующий – на 8–10 лет, болезнь чаще поражает девочек [1]. По данным Министерства здравоохранения Республики Беларусь, в 2013 году число детей и подростков, находящихся под диспансерным наблюдением, составило 543 пациента, из них 194 ребенка – это дети-инвалиды [4].

Этиология и патогенез ЮРА до настоящего времени во многом остаются неясными, хотя имеются значительные достижения в вопросах диагностики и лечения этого заболевания. Накоплены данные, свидетельствующие о роли наследственности и факторов окружающей среды в развитии ЮРА [5]. В мировой литературе имеется большое количество сведений об ассоциации различных генов с ЮРА, при этом наиболее часто изучают гены главного комплекса гистосовместимости [5, 6, 7 и др.]. Некоторые гены,

ассоциированные с ЮРА, обуславливают генетическую предрасположенность и к другим аутоиммунным заболеваниям [5].

В патогенезе ЮРА значительная роль отводится действию фактора некроза опухоли альфа (*TNFA*), который является важным провоспалительным цитокином, играющим роль в регуляции дифференцировки, пролиферации и гибели клеток, а также при воспалении, врожденных и адаптивных иммунных реакциях. Наличие полиморфизма в регуляторной области может помешать транскрипции гена *TNFA*, что в свою очередь влияет на уровень циркулирующего цитокина и тем самым увеличивает восприимчивость человека к различным заболеваниям (инфекционным, опухолевым, аутоиммунным, нейродегенеративным и др.) [9]. Многочисленные клинические исследования позволили установить, что в сыворотке крови, синовиальной жидкости и синовиальных тканях пациентов с ЮРА отмечается повышенное содержание *TNFA*. При этом его уровень в сыворотке крови коррелирует с активностью воспалительного процесса, определяемой по клиническим признакам [10].

При ЮРА отмечаются увеличенная концентрация активных форм кислорода в крови пациентов [11] и повышенные уровни спонтанных и индуцированных повреждений ДНК, которые элиминируются системой эксцизионной репарации оснований (BER) [12, 13]. Низкая скорость репарации в лимфоцитах пациентов с ЮРА указывает на снижение активности этой системы [12]. Среди факторов окружающей среды

как потенциальных индукторов ЮРА значительное место занимают мутагены, индуцирующие разнообразные аддукты ДНК, которые репарируются системой эксцизионной репарации нуклеотидов (NER). Полиморфизм генов *BER* и *NER* может изменить ответ на воспаление посредством влияния на эффективность репарации ДНК [14]. В литературе имеются единичные работы о взаимосвязи генов репарации ДНК с ревматическими заболеваниями [14, 15, 16],

поэтому изучение полиморфизма этих генов при ЮРА является актуальным.

Цель данного исследования – изучить распределение генотипов и аллелей гена *TNFA* -308 G→A, а также полиморфных вариантов генов эксцизионной репарации *XPB* Asp312Asn (934 G→A) и *XRCC1* Arg399Gln (1196 G→A) у детей с диагнозом ЮРА по сравнению с контрольной группой детей без аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Материалы и методы

Участники исследования. В работе проанализированы образцы ДНК от 100 детей, которые проходили лечение в УЗ «2-я городская детская клиническая больница» г. Минска в 2012–2013 гг. Основную группу исследования составили 40 пациентов с подтвержденным диагнозом ЮРА. Группа сравнения включала 60 практически здоровых детей (вегетативная дисфункция и малые аномалии развития сердца). В соответствии с международными нормами [17], от родителей каждого участника исследований получено информированное согласие и заполненная анкета, утвержденные Этическим комитетом УО «2-я городская клиническая больница». Забор образцов цельной крови (3–5 мл) проводился медицинским персоналом в вакуутайнеры с распыленной ЭДТА. Материалом для исследования полиморфизма генов *TNFA* -308 G→A, *XPB* Asp312Asn и *XRCC1* Arg399Gln послужила геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической венозной крови с использованием протеиназы К с последующей фенольно-хлороформной экстракцией [18].

Генотипирование образцов проводили методом полимеразной цепной реакции с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Для анализа полиморфизма -308 G→A в гене *TNFA* была проведена амплификация фрагмента промоторной области длиной 107 п.о. с использованием следующей пары специфичных олигонуклеотидных праймеров: (F) 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' и (R) 5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3' [19]. Реакционную смесь готовили также согласно публикации [19]. Условия ПЦР под-

бирали экспериментально: 2 мин денатурации при температуре 94 °С, далее 32 цикла при 94 °С 60 с, 60 °С 60 с, 72 °С 60 с, завершающий шаг – 72 °С в течение 3 мин. Полученные фрагменты обрабатывали при 37 °С в течение ночи рестриктазой *NcoI*. Продукты рестрикции разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле. Аллели А соответствовал фрагмент длиной 107 п.о., а аллели G – два фрагмента длиной 87 и 20 п.о.

Для амплификации фрагмента 10 экзона гена *XPB*, который содержит полиморфный сайт рестрикции *StyI*, была использована следующая пара олигонуклеотидных праймеров: (F) 5'-CTG TTG GTG GGT GCC CGT ATC TGT TGG TCT-3' и (R) 5'-TAA TAT CGG GGC TCA CCC TGC AGC ACT TCC T-3' [20]. Реакционная смесь и условия ПЦР были подобраны согласно [20]. Продукты амплификации обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой *Eco130I* (*StyI*) при 37 °С в течение ночи. Электрофоретическое разделение продуктов рестрикции проводили в 2%-ном агарозном геле с бромистым этидием с последующей визуализацией на УФ-трансиллюминаторе. Гомозиготу дикого типа Asp/Asp (G/G) в полиморфном локусе гена *XPB* Asp312Asn определяли по присутствию в геле фрагментов ДНК длиной 507 и 244 п.о.; гомозиготу минорной аллели Asn/Asn (A/A) – по трем фрагментам длиной 474, 244 и 33 п.о., а гетерозиготу Asp/Asn (G/A) – по четырем фрагментам длиной 507, 474, 244 и 33 п.о.

Для анализа полиморфного участка гена *XRCC1* Arg399Gln использована пара олигонуклеотидных праймеров (F) 5'-GGA CTG TCA CCG CAT GCG TCG G-3' и (R) 5'-

GGCTGGGACACCTGTGT-3'. Праймеры и условия амплификации были подобраны согласно Arizono et al. [21]. Амплифицированные фрагменты подвергали рестрикционному расщеплению эндонуклеазой MspI. Для разделения продуктов рестрикции проводился электрофорез в 2%-ном агарозном геле. О наличии гомозигот дикого типа Arg/Arg (G/G) судили по присутствию в геле фрагментов ДНК длиной 115 и 34 п.о.; фрагмент длиной 149 п.о. соответствовал гомозиготе минорной аллели Gln/Gln (A/A), а фрагменты длиной 149, 115 и 34 п.о. указывали на гетерозиготу Arg/Gln (G/A).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 for Windows. При сравнении частот генотипов в группах пациентов и контроля использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона; при условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса и точный тест Фишера. Подсчитывали отношение шансов (odds ratio – OR) для оценки ассоциации между определенными генотипами и риском развития заболевания. OR указан с 95%-ным доверительным интервалом (confidence interval – CI) [22].

Результаты и обсуждение

Характеристика групп обследованных детей представлена в табл. 1. Из таблицы видно, что в исследовании принимали участие дети в возрасте от 1 года до 17 лет, средний возраст пациентов с ЮРА составил $8,4 \pm 4,9$ лет, а в контрольной группе – $13,2 \pm 2,9$ лет.

Среди детей с ЮРА девочки встречались в 75% случаев, а мальчики – в 25%. Группа контроля была подобрана таким образом, чтобы соотношение по полу между девочками и мальчиками было 3:1, как в группе детей с ЮРА.

Таблица 1

Количественная характеристика обследованных детей

Параметры		ЮРА n = 40	Группа контроля n = 60
Средний возраст, лет (m ± SD*)		8,38 ± 4,91	13,17 ± 2,88
Максимальный возраст, лет		17	17
Минимальный возраст, лет		1	6
Пол	Мальчики, абс. (%)	10 (25%)	15 (25%)
	Средний возраст, лет (m ± SD)	10 ± 6,22	11,67 ± 1,84
	Девочки, абс. (%)	30 (75%)	45 (75%)
	Средний возраст, лет (m ± SD)	7,83 ± 4,39	13,67 ± 3

* – среднее ± стандартное отклонение

Функциональная характеристика исследуемых генов. Ген *TNFA* расположен в шестой хромосоме человека (6p21.3) в локусе, кодирующем молекулы главного комплекса гистосовместимости первого (HLA-A, B, C) и второго классов (HLA-DP, DQ, DR), между генами *Lta* и *Ltb*, имеет размер 2762 п.н. и содержит 4 экзона. Известно более 30 полиморфных вариантов этого гена (SNP-полиморфизмы, микросателлиты), но только около половины из них влияют на экспрессию *TNFA* *in vivo* [9]. Отдельные полиморфизмы были найдены благодаря сильной связи с определенными

HLA-аллелями. Полиморфизм промоторной области гена *TNFA* -308 G→A (rs 1800629) приводит к замене гуанина на аденин в позиции 308 и обуславливает появление редкой аллели, сцепленной с гаплотипами HLA-A1, B8, DR3 главного комплекса гистосовместимости. Отмечено, что такое замещение влияет на усиление активности промоторной области, при этом происходит 6-7-кратное повышение уровня транскрипции гена *TNFA*. Соответствующий протеин синтезируется как мембранный белок с молекулярной массой 26 кДа (233 аминокислоты) [23].

Кросс-комплементирующий ген эксцизионной репарации группы 2 (*ERCC2*), или *XPB*, картирован на 19 хромосоме (19q13.32) и состоит из 23 экзонов. Соответствующий продукт длиной 760 аминокислот (87 кДа) вовлечен в эксцизионную репарацию нуклеотидов и интегрирован в комплекс транскрипционного фактора BTF2/TFIIH; имеет АТФ-зависимую геликазную активность, способствует расплетанию нитей ДНК. В литературе наиболее часто ссылаются на 4 полиморфизма единичных нуклеотидов (SNP), среди которых Asp312Asn (rs1799793) имеет достаточно высокий уровень гетерозиготности. Этот полиморфизм отвечает за замену аспарагиновой кислоты (Asp) на аспарагин (Asn), приводя к дисбалансу между ними. Он влияет на различные взаимодействия белков, уменьшая активность TFIIH-комплекса [24].

Ген *XRCC1* картирован на 19 хромосоме в локусе 19q13.31. Продукт гена (633 аминокислоты, 69,5 кДа) является связующим белком, который участвует в эксцизионной репарации оснований и репарации односторонних разрывов ДНК, взаимодействуя с ДНК-полимеразой β , ДНК-лигазой III α , АП-эндонуклеазой 1 (APE1) и поли-(АДФ-рибоза)-полимеразой (PARP) на поврежденном сайте ДНК. Arg399Gln полиморфизм 10 экзона гена *XRCC1* (rs25487) затрагивает его центральный домен, необходимый для активации репарации оснований, приводит к замене аминокислот аргинина на глутамин, изменяя функции продукта и увеличивая чувствительность генома к ряду ДНК-повреждающих агентов, в том числе к активным формам кислорода [24].

Результаты генотипирования. При анализе полиморфизма гена *TNFA* -308 G→A у детей с ЮРА было выявлено статистически значимое увеличение частоты генотипа G/G ($p = 0,042$ при двустороннем варианте точного критерия Фишера) по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Частота аллели G была также повышена (табл. 3). Среди больных ЮРА носители G/G-генотипа встречались в 95% случаев, а в группе контроля в 78,3% случаев. Носители вариантного A/A генотипа не обнаружены в обеих группах (табл. 2). Из обзорной статьи Scardapane et al. видно, что нет однозначных данных об ассоциации полиморфизма гена *TNFA* -308 G→A с ЮРА, т.к. в части исследований установлена статистически значимая ассоциация -308A-аллели с развитием ЮРА, а другие авторы не нашли никаких ассоциаций [25]. Мета-анализ 7 европейских популяций, проведенный Lee et al., показал отсутствие связи между A-аллелью *TNFA* -308 и ЮРА [26], что находится в соответствии с полученными нами данными. Кроме того, известно о корреляции между уровнем продукта гена *TNFA* и степенью активности заболевания [10]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что повышение уровня соответствующего протеина при ЮРА отражает воспалительную активность заболевания. Обнаруженное нами увеличение частоты генотипа G/G и аллели G, по всей видимости, является благоприятным для пациентов. Можно ожидать, что у них не происходит гиперэкспрессии гена *TNFA* как результата замены гуанина на аденин, и уровень содержания протеина TNF α меньше, чем могло бы быть при такой замене, а, следовательно, активность заболевания должна быть меньше.

Таблица 2

Распределение генотипов генов *TNFA* -308, *XPB* 312 и *XRCC1* 399 у детей с ЮРА и в контрольной группе

Генотип	ЮРА (40 детей)		Группа контроля (60 детей)		χ^2	p	OR (95% CI)
	Абс.	%	Абс.	%			
TNF α -308 G→A							
G/G	38	95	47	78,3	4,00*	0,042**	5,26 (1,12–24,73)
G/A	2	5	13	21,7		0,042**	0,19 (0,04–0,90)
A/A	0	0	0	0		–	–
XPD Asp312Asn							
G/G	16	40	26	43,3	2,78	> 0,05	0,87 (0,39–1,97)
G/A	19	47,5	20	33,3		> 0,05	1,81 (0,80–4,11)
A/A	5	12,5	14	23,3		> 0,05	0,47 (0,15–1,43)

Продолжение табл. 2

Генотип	ЮРА (40 детей)		Группа контроля (60 детей)		χ^2	p	OR (95% CI)
	Абс.	%	Абс.	%			
XRCCI Arg399Gln							
G/G	20	50	21	35	7,94	> 0,05	1,86 (0,82–4,20)
G/A	11	27,5	33	55		0,008**	0,31 (0,13–0,73)
A/A	9	22,5	6	10		> 0,05	2,61 (0,85–8,04)

* – значение критерия χ^2 с поправкой Йетса** – значение *p* при двустороннем варианте точного критерия Фишера

При изучении распределения генотипов гена *XPDA* Asp312Asn (934G→A) было показано, что частота встречаемости функционально неполноценного генотипа A/A (Asn/Asn) составляет 12,5% у детей с ЮРА и 23,3% в контрольной группе (табл. 2), однако статистически значимых различий не найдено. Частоты минорной аллели A также не различаются между группами (табл. 3).

Как видно из табл. 2, анализ частот распределения генотипов гена *XRCCI* Arg399Gln (1196G→A) показал статистически значимое

(*p* < 0,05 по двустороннему варианту точного критерия Фишера) увеличение частоты встречаемости гетерозигот G/A (Arg/Gln) у детей в контрольной группе (55%) по сравнению с аналогичным показателем у пациентов с ЮРА (27,5%), что может свидетельствовать о пониженном риске развития данного заболевания у его носителей. Однако при анализе частоты распределения аллелей гена *XRCCI* Arg399Gln в исследуемых группах детей не было выявлено статистически значимых отличий (табл. 3).

Таблица 3

Распределение аллелей генов *TNFA* -308, *XPDA* 312 и *XRCCI* 399 у детей с ЮРА и в контрольной группе

Аллель	ЮРА (40 детей)		Группа контроля (60 детей)		χ^2	p	OR (95% CI)
	Абс.	%	Абс.	%			
TNFα -308 G→A							
G	78	97,5	107	89,2	3,68*	0,052**	4,74 (1,04–21,60)
A	2	2,5	13	10,8			0,21 (0,05–0,96)
XPD Asp312Asn							
G (Asp)	51	63,8	72	60	0,29	> 0,05	1,17 (0,65–2,10)
A (Asn)	29	36,3	48	40			0,85 (0,48–1,53)
XRCC1 Arg399Gln							
G (Arg)	51	63,8	75	62,5	0,03	> 0,05	1,06 (0,59–1,90)
A (Gln)	29	36,3	45	37,5			0,95 (0,53–1,70)

* – значение критерия χ^2 с поправкой Йетса** – значение *p* при двустороннем варианте точного критерия Фишера

Полиморфизм генов эксцизионной репарации ДНК часто изучается в связи с онкологическими заболеваниями. В литературе почти нет работ, посвященных исследованию влияния полиморфизма генов репарации ДНК на ревматические заболевания. В работе Yosunkaya et al. на пациентах из Турции при изучении полиморфизма гена *XRCCI* Arg-

399Gln было показано, что 399Gln-аллель является фактором риска развития ревматоидного артрита у взрослых [14]. При изучении полиморфизма гена *XRCCI* в 3 кодонах (194, 280 и 399) на 40 пациентах с ревматоидным артритом из Японии было показано, что 280H-аллель статистически значимо ассоциирована с развитием заболевания [15]. Кроме

того, мета-анализ популяций Тайваня, Бразилии и Польши показал, что генотипы Gln/Gln или Arg/Gln, а также Gln-аллель гена *XRCC1* Arg399Gln ассоциированы с риском возникновения системной красной волчанки [16]. Следует отметить, что частоты минорных аллелей и распределение генотипов изученных

генов репарации существенно отличаются между европейцами, белым населением США и Канады и населением Азиатских стран [27], что может вносить свой вклад в оценку частот полиморфных вариантов этих генов в связи с ревматическими и другими заболеваниями в разных странах.

Заключение

Были проанализированы образцы геномной ДНК, полученные от представителей детского населения Беларуси (100 человек) в возрасте от 1 года до 17 лет по полиморфизму генов *TNFA* -308 G→A, *XPB* Asp312Asn и *XRCC1* Arg399Gln. При анализе полиморфизма гена *TNFA* -308 G→A выявлена увеличенная частота генотипа G/G и аллели G дикого типа у детей с ЮРА. Обнаружено также двукратное повышение частоты гетерозиготного генотипа гена эксцизионной репарации оснований *XRCC1* Arg399Gln в контрольной группе по сравнению с пациентами с ЮРА. Для подтверждения выявленных ассоциаций необходимы дальнейшие исследования на большей выборке пациентов.

Авторы статьи выражают благодарность процедурной медсестре отделения кардиологии УЗ «2-я городская детская клиническая больница» Е.А. Денкевич за сбор образцов крови, научному сотруднику лаборатории генетической безопасности ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Н.В. Савиной за помощь в доставке образцов и выделении ДНК, а также к.б.н., ведущему научному сотруднику лаборатории моделирования генетических процессов ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Э.В. Крупновой за ценные советы по анализу данных при написании статьи.

Список использованных источников

1. Сукало, А.В. Особенности клиники и лечения тяжелых форм ювенильного ревматоидного артрита у детей и подростков / А.В. Сукало, Н.Л. Макаревич // Журнал ГГМУ. – 2005. – № 3. – С. 167–170.
2. Плавская, Н.П. Ювенильный артрит: современные представления о проблеме / Н.П. Плавская // Актуальные вопросы внутренних болезней: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 1 ноября 2013 г. / УО «Белорусский государственный медицинский университет»; под ред. Н.Ф. Сороки, В.Е. Ягура. – Минск, 2013. – С. 37.
3. 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: initiation and safety monitoring of therapeutic agents for the treatment of arthritis and systemic features / T. Beukelman [et al.] // Arthritis Care Res. (Hoboken). – 2011. – Vol. 63, № 4. – P. 465–482.
4. Всемирный день борьбы с артритом 2013 [Электронный ресурс] / Министерство здравоохранения Республики Беларусь. – Режим доступа: <http://minzdrav.gov.by/ru/static/press-release?id=685>. – Дата доступа: 10.11.2013.
5. Angeles-Han, S. The Genetics of Juvenile Idiopathic Arthritis: What Is New in 2010? / S. Angeles-Han, S. Prahalad // Curr. Rheumatol. Rep. – 2010. – Vol. 12. – P. 87–93.
6. Prahalad, S. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis [Electronic resource] / S. Prahalad, D.N. Glass // Pediatr Rheumatol Online J. – 2008. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2515830/>. – Date of access: 01.04.2014.
7. Investigation of rheumatoid arthritis susceptibility loci in juvenile idiopathic arthritis confirms high degree of overlap / A. Hinks [et al.] // Ann Rheum. Dis. – 2012. – Vol. 71. – P. 1117–1121.
8. Prahalad, S. Is juvenile rheumatoid arthritis/juvenile idiopathic arthritis different from rheumatoid arthritis? / S. Prahalad, D.N. Glass // Arthritis Res. – 2002. – Vol. 4. – P.303–310.
9. Qidwai, T. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence / T. Qidwai, F. Khan // Scandinavian Journal of Immunology. – 2011. – Vol.74. – P.522–547.
10. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels in the serum and synovial fluid in

- relation to bone mineral density and turnover in children with juvenile idiopathic arthritis / A. Gorska [et al.] // *Centr. Eur. J. Immunol.* – 2008. – Vol. 33, № 4. – P. 216–219.
11. Circulating progenitor cells in rheumatoid arthritis: association with inflammation and oxidative stress / A. Lo Gullo [et al.] // *Scand J Rheumatol.* [Electronic resource]. – 2013. – Mode of access: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/03009742.2013.836564>. – Date of access: 09.04.2014.
12. Повреждения ДНК и их репарация при ювенильном ревматоидном артрите и в контрольных группах детей / Н.В. Никитченко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2013. – Т. 16. – С. 7–15.
13. Genotoxicity of anti-tumor necrosis factor therapy in patients with juvenile idiopathic arthritis / E. Demirkaya [et al.] // *Arthritis Care & Research.* – 2010. – Vol. 62, № 1. – P. 73–77.
14. Rheumatoid arthritis risk associates with DNA repair gene *XRCC1* Arg399Gln polymorphism in Turkish patients / E. Yosunkaya [et al.] // *Rheumatol Int.* – 2012. – Vol. 32. – P. 1265–1269.
15. Possible association of the X-ray cross complementing gene 1 (*XRCC1*) Arg280His polymorphism as a risk for rheumatoid arthritis / A. Koyama [et al.] // *Rheumatol Int.* – 2006. – Vol. 26. – P. 749–751.
16. *XRCC1* Arg399Gln Gene Polymorphism and the Risk of Systemic Lupus Erythematosus in the Polish Population / T. Warchoł [et al.] // *DNA and cell biology.* – 2012. – Vol. 31, № 1. – P. 50–56.
17. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [Electronic resource] / World Medical Association Declaration of Helsinki. – 59th WMA General Assembly, Seoul, October, 2008. – Mode of access: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/17c.pdf>. – Date of access: 15.02.2014.
18. Sambrook, J. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis // *Molecular Cloning: a laboratory manual.* – 2nd ed. – Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – P. 9.14–9.23.
19. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (*TNF* alpha) gene detectable by *NcoI* restriction of PCR product / A.G. Wilson [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1992. – Vol. 1, № 5. – P. 353.
20. Modulation of nucleotide excision repair capacity by *XPB* polymorphisms in lung cancer patients / M.R. Spitz [et al.] // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61, № 4. – P. 1354–1357.
21. Arizono, K. DNA repair gene *hOGG1* codon 326 and *XRCC1* codon 399 polymorphisms and bladder cancer risk in a Japanese population / K. Arizono, Y. Osada, Y. Kuroda // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 38, № 3. – P. 186–191.
22. Гланц, С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
23. Hajeer, A.H. Influence of *TNF* alpha gene polymorphisms on *TNF* alpha production and disease / A.H. Hajeer, I.V. Hutchinson // *Hum. Immunol.* – 2001. – Vol. 62, № 11. – P. 1191–1199.
24. Распределение полиморфных вариантов генов эксцизионной репарации *XPB*, *XRCC1*, *hOGG1* у взрослого населения Беларуси / Н.В. Никитченко [и др.] // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2013. – № 2. – С. 4–9.
25. *TNF-α* Polymorphisms in Juvenile Idiopathic Arthritis: Which Potential Clinical Implications? [Electronic resource] / A. Scardapane [et al.] // *International Journal of Rheumatology.* – 2012. – Mode of access: <http://www.hindawi.com/journals/ijr/2012/756291/>. – Date of access: 17.12.2013.
26. Lee, Y.H. *TNF* promoter -308 A/G and -238 A/G polymorphisms and juvenile idiopathic arthritis: a meta-analysis / Y.H. Lee, S.C. Bae, G.G. Song // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – Vol. 39, № 8. – P. 8497–8503.
27. Полиморфизм генов эксцизионной репарации *XPB*, *XRCC1*, *hOGG1* у населения Республики Беларусь и его влияние на канцерогенез / О.П. Романюк [и др.] // *Экологическая генетика.* – 2013. – Т. XI, № 4. – С. 45–63.

Дата поступления статьи 07 мая 2014 г.

ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПЕЙЗАЖ РОТАВИРУСОВ – ЭТИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ ОСТРЫХ ГАСТРОЭНТЕРИТОВ У ДЕТЕЙ В Г. МИНСКЕ В 2012–2013 ГГ.

¹ УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т. Дзержинского, 83

² Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии

Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23

Введение

В настоящее время острые кишечные инфекции занимают одно из ведущих мест среди инфекционных заболеваний, уступая по частоте лишь гриппу и острым респираторным инфекциям. Ротавирусы являются наиболее распространенной причиной тяжелого гастроэнтерита у детей младшего возраста во всем мире [1]. Ежегодно регистрируется более 100 млн. случаев ротавирусного гастроэнтерита, являющегося причиной 2 млн. госпитализаций и около 600 тыс. смертей детей в возрасте до 5-ти лет, при этом до 80% летальных случаев приходится на развивающиеся страны Юго-Восточной Азии, Африки и Латинской Америки [2, 3]. Однако эпидемиологические исследования показывают, что и в экономически развитых странах данная проблема стоит достаточно остро [4, 5].

Согласно данным официальной регистрации, в Республике Беларусь ежегодно выявляется 3–5 тысяч заболевших ротавирусной инфекцией (2008 г. – 3553, 2009 г. – 4013, 2010 г. – 5113, 2011 г. – 5206, 2012 г. – 3901). Подавляющее большинство заболевших (до 80%) – это дети в возрасте 0–2 года [6, 7]. Практически все зарегистрированные случаи ротавирусной инфекции – это случаи, потребовавшие госпитализации, что и определяет высокую социально-экономическую значимость данной инфекции.

Ротавирусы принадлежат к роду *Rotavirus*, который по наличию группоспецифического антигена VP6 разделен на семь групп, обозначаемых буквами латинского алфавита от А до G [8]. Наибольший интерес в клинической вирусологии вызывают ротавирусы группы А. Зрелый вирион ротавируса лишен липополисахаридной оболочки, имеет сферическую

форму и состоит из ядра, включающего в себя геном, представленный одиннадцатью сегментами двуцепочечной РНК и окруженный тремя концентрическими слоями белковых оболочек [8]. Инфекционной активностью обладают только зрелые трехслойные частицы вируса. Каждый геномный сегмент РНК кодирует один вирусный белок (за исключением 11-го сегмента, кодирующего два белка): 6 структурных (VP1–VP6) и 6 неструктурных (NSP1–NSP6) [8,9].

Идентификацию серотипа ротавируса осуществляют на основании антигенной специфичности его поверхностных структурных белков VP4 (Р-тип) и VP7 (G-тип). При этом определение серотипа ротавируса является достаточно трудоемкой задачей и требует соответствующих реагентов (моноклональных антител), поэтому при характеристике вируса определяют его генотип. При этом для G-типа серотипы и генотипы вируса совпадают. В то же время, число Р-генотипов значительно превышает число Р-серотипов, поскольку гены, кодирующие один и тот же Р-серотип, могут различаться. Чтобы избежать путаницы в обозначениях, Р-генотип записывается в квадратных скобках: Р[8], Р[4] и др.

К настоящему времени выявлено 27 различных G-генотипов и 35 Р-генотипов ротавирусов [10]. Теоретически при произвольной комбинации G- и Р-типов может образоваться огромное количество различных вариантов ротавирусов, однако реально выявляемое число G/Р-комбинаций оказывается значительно меньшим и составляет не более 70 [10]. В Европе и в мире в целом наиболее широко распространены 5 генотипов ротавирусов: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8] [11].

Однако пейзаж циркулирующих в различных регионах мира ротавирусов имеет свои особенности и изменяется с течением времени. Например, генотипы ротавирусов, которые редко встречаются в Европейском регионе, достаточно широко распространены в Африканском [12].

В последнее десятилетие интерес к проблеме ротавирусной инфекции возрос в связи с разработкой, лицензированием и внедрением ротавирусной вакцины в национальные программы иммунизации. Плановая специфическая вакцинопрофилактика этой инфекции в Республике Беларусь пока не проводится.

Материалы и методы

Материалом для изучения генетического разнообразия ротавирусов, циркулировавших в 2012–2013 гг. в г. Минске, являлись 163 образца стула (65 – в 2012 г. и 98 – в 2013 г.) от детей с лабораторно подтвержденным диагнозом ротавирусного гастроэнтерита, госпитализированных в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска (ГДИКБ) в анализируемый период времени.

Для определения целесообразности внедрения вакцинопрофилактики требуется изучение не только бремени заболеваемости, но и определение генетического пейзажа циркулирующих ротавирусов.

Таким образом, целью данного исследования было определение генотипического пейзажа ротавирусов, циркулировавших в 2012–2013 гг. в г. Минске, выявление преобладающих генотипов в период подъема заболеваемости ротавирусной инфекцией и в межсезонный период, а также установление смены доминирующих штаммов на протяжении нескольких лет.

Диагностику ротавирусной инфекции осуществляли на основании детекции антигена ротавируса в образцах стула с использованием отечественной иммуноферментной тест-системы «РОТА-АГ» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Образцы для генотипирования были взяты пропорционально количеству случаев заболевания, зарегистрированных в каждом месяце (рис. 1)

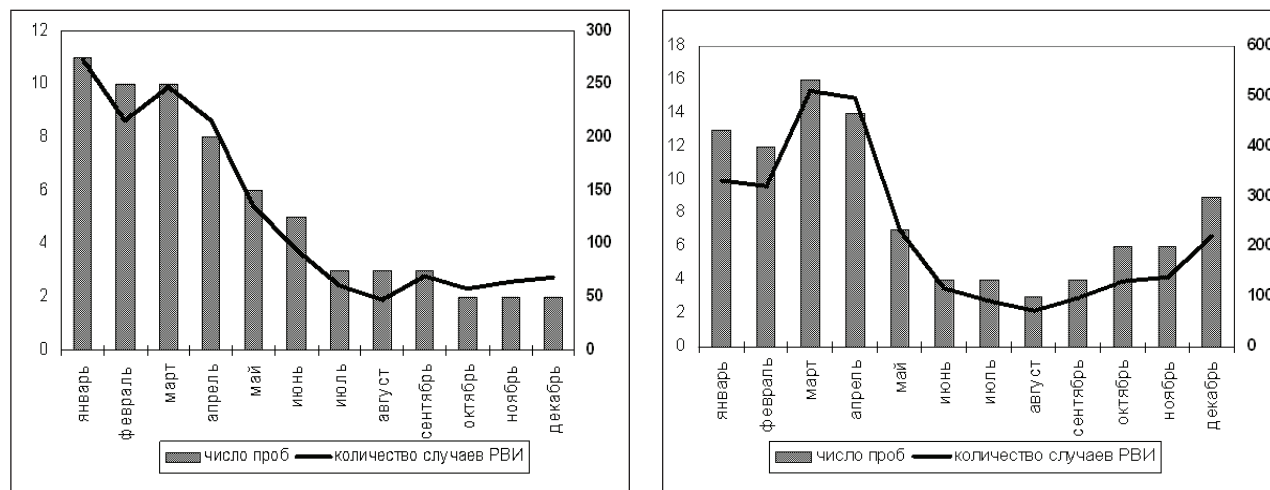


Рис. 1. Распределение проб, отобранных для генотипирования, по месяцам: а) в 2012 г.; б) в 2013 г.

Выделение РНК ротавирусов из предварительно приготовленной 10%-ной суспензии стула выполняли с использованием автоматической системы для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах MagMAX Express (Applied Biosystems, США) с наборами 5X MagMAX-96 Viral Isolation kit (Ambion, США). Генотипирование ротавирусов осуществляли с помощью мультиплексной

полугнездовой ОТ-ПЦР. Для амплификации фрагмента гена *VP7* с целью последующего G-генотипирования использовали праймеры 9con1L и VP7-R [13]. Для амплификации фрагмента гена *VP4* с целью последующего Р-генотипирования использовали праймеры con3 и con2 [13]. ОТ-ПЦР проводили в один раунд с использованием набора QIAGEN OneStep RT-PCR kit, QIAGEN (Германия),

содержащего смесь ферментов: обратные транскриптазы Omniscript и Sensiscript и Hot-StarTaq ДНК полимеразу. Реакцию проводили в следующих условиях: обратная транскрипция – 30 мин при 42 °С, денатурация смеси обратных транскриптаз и активация полимеразы – 15 мин при 95 °С и 40 циклов амплификации. Каждый цикл включал: денатурацию

при 94 °С – 30 с, отжиг праймеров при 42 °С – 30 с, элонгацию при 72 °С – 45 с. Для второго раунда использовали набор специфических праймеров для определения G- и P-генотипов [14]. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 3%-ном агарозном геле с добавлением красителя Gelstar 10000X, Lonza (США) для визуализации ДНК.

Результаты и обсуждение

Проведенное генотипирование 163 ротавирусов по генам, кодирующим структурные белки VP7 и VP4, позволило идентифицировать G-генотип ротавирусов во всех исследуемых образцах, P-генотип – в 162 ($99,4 \pm 0,6\%$) образцах.

Как известно, применение полугнездовой мультимплексной ОТ-ПЦР позволяет успешно определить генотип ротавирусов, но в то же время данный метод разработан преимущественно для выявления широко распространенных генотипов (G1–4, G9 и P[4], P[6], P[8], P[9]) и не включает необходимый набор праймеров для детекции редко встречающихся генотипов и необычных для данного региона G-P-комбинаций.

В исследуемых пробах за два года исследования в различных сочетаниях были выявлены 3 P- и 5 G-генотипов ротавируса. Так, среди P-генотипов наиболее распространенным оказался P[8], обнаруженный в 150 пробах ($92 \pm 2\%$). Достоверно реже выявлялись генотип P[4], идентифицированный в 11 пробах ($6,7 \pm 1,9\%$), и генотип P[9] ($0,6 \pm 0,5\%$), обнаруженный только в 1 образце в 2013 г. Полученные данные соответствуют данным литературы, согласно которым, наиболее часто встречающимися и повсеместно распространенными P-генотипами являются варианты P[8] и P[4] [12].

Наиболее часто выявляемым G-типом был G4, идентифицированный в 104 образцах из 163 ($63,8 \pm 3,8\%$). На втором месте был G1, выявленный в 20 пробах ($12,3 \pm 2,6\%$). Третьим по частоте оказался G3, обнаруженный в 17 образцах ($10,4 \pm 2,4\%$), четвертым – G2 (в 11 пробах; $6,7 \pm 2\%$), пятым – G9, идентифицированный лишь в 7 образцах ($4,3 \pm 1,5\%$).

Поскольку гены, кодирующие два связанных с нейтрализацией протеина (VP7(G) и VP4(P)), расщепляются независимо, современная классификация ротавирусов учитывает характеристику

обоих этих генов. Таким образом, в г. Минске в 2012–2013 гг. были распространены 6 генетических G-P-вариантов ротавируса: G4P[8], G1P[8], G3P[8], G2P[4], G9P[8] и G3P[9] (рис. 2). Доминирующим на протяжении двух лет анализа среди всех генотипов был G4P[8], обнаруженный в 104 пробах ($63,8 \pm 3,8\%$), при этом его удельный вес возрос от $55,4 \pm 6\%$ в 2012 г. до $69,3 \pm 5,5\%$ в 2013 г. Вторым по распространенности генотипом стал G1P[8], составивший $12,3 \pm 2,6\%$ и идентифицированный в 20 пробах из 163. Вклад данного генотипа был равнозначным в 2012 г. и 2013 г. и составил $12,3 \pm 4\%$ (8 из 65) и $12,2 \pm 3,3\%$ (12 из 98) соответственно. Третьим по частоте выявления в 2013 г. стал, занимавший в 2012 г. второе место, генотип G3P[8], доля которого составила $9,8 \pm 2,3\%$ (16 из 163) и снизилась с $21,5 \pm 5\%$ (14 из 65) в 2012 г. до $2 \pm 1,4\%$ (2 из 98) в 2013 г. В $6,7 \pm 1,9\%$ проб был идентифицирован, занявший четвертое место, генотип G2P[4] (11 из 163), выявляемый с частотой $6,2 \pm 2,9\%$ и $7,1 \pm 2,5\%$ в 2012 г. и 2013 г. соответственно. Разнозначный вклад ($6,1 \pm 1,9\%$) в генотипический пейзаж ротавирусов внес и генотип G9P[8], обнаруженный в 4 пробах в 2012 г. и 7 пробах в 2013 г. На последнем месте оказался генотип G3P[9], идентифицированный только в 1 пробе ($0,6 \pm 0,5\%$) в 2013 г.

Пейзаж циркулирующих в 2012–2013 гг. ротавирусов не являлся постоянным в течение года. Наибольшее генотипическое разнообразие изолятов приходилось на первую половину года (с декабря по май включительно), которая соответствует сезонному подъему ротавирусной инфекции. Так, в течение данного времени генотипический пейзаж включал 6 различных генотипов ротавируса: G4P[8], G1P[8], G3P[8], G2P[4], G9P[8] и G3P[9]. В межсезонный период выявляемые ротавирусы характеризовались меньшим разнообразием и были представлены генотипами G4P[8], G1P[8], G3P[8] и G2P[4] (рис. 3)

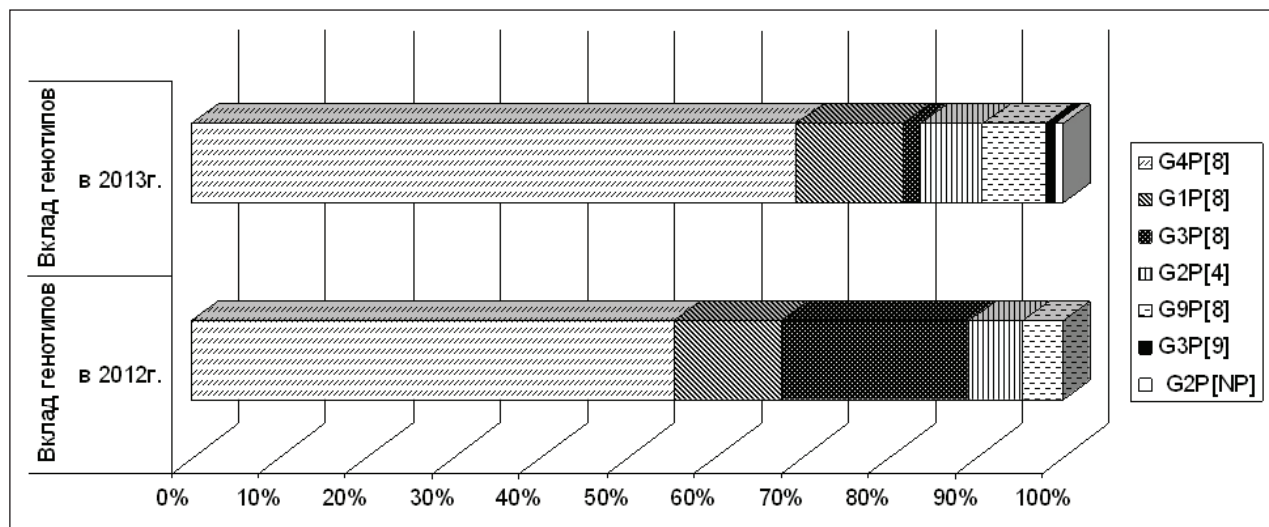


Рис. 2. Генотипический пейзаж ротавирусов, циркулировавших в г. Минске в 2012–2013 гг.

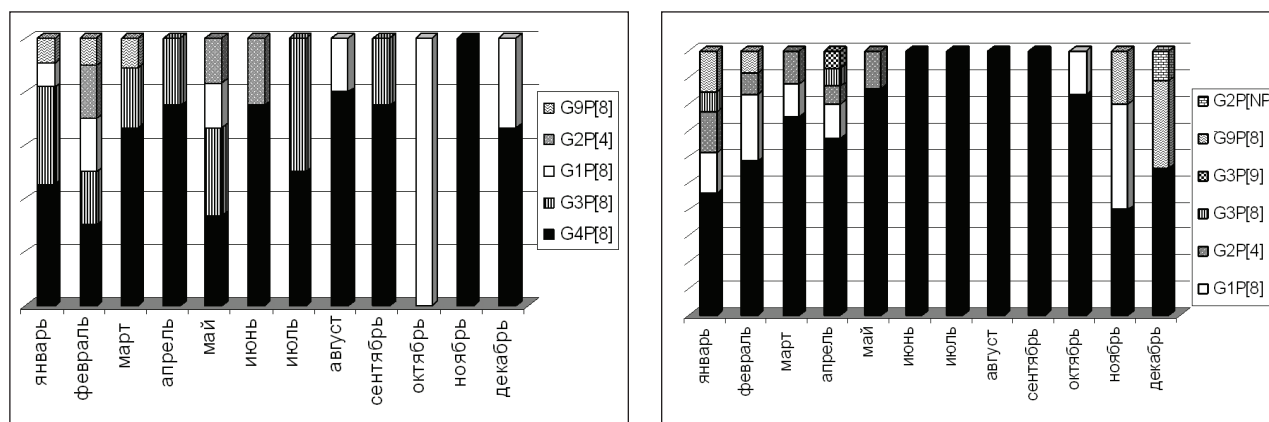


Рис. 3. Сезонное распределение различных генотипов ротавируса, циркулирующих в г. Минске: а) в 2012 г.; б) в 2013 г.

Из полученных данных видно, что ротавирусы генотипа G4P[8] сохраняли свои лидирующие позиции на протяжении двух лет анализа и выявлялись ежемесячно. При этом вклад данного генотипа снижался в сезонный подъем ротавирусной инфекции и возрастал в межсезонный период. Так, доля генотипа G4P[8], составлявшего в межсезонный период $77,7 \pm 9\%$ в 2012 г. и $84,6 \pm 7\%$ в 2013 г., снизилась до $50 \pm 6,6\%$ и $64 \pm 5,6\%$, соответственно, в сезонный подъем.

В течение каждого из двух лет наблюдения ротавирусы генотипа G2P[4] регистрировались только в первой половине года и вносили в генотипический пейзаж ротавирусов, циркулировавших с января по май, от $8,3 \pm 3,9\%$ (в 2012 г.) до $11 \pm 3,9\%$ (в 2013 г.). Преимущественно в первой половине 2012 г. выявлялся

и генотип G3P[8], который обусловил $27,1 \pm 5,5\%$ случаев острого гастроэнтерита (ОГЭ), выявленных в период с января по июнь, и только $5,9 \pm 2,9\%$ гастроэнтеритов, выявленных во второй половине года. В 2013 г. вклад генотипа G3P[8] был существенно ниже ($2 \pm 1,5\%$) и вирусы данного генотипа обнаруживались только в январе и апреле.

Сезонные различия в течение двух лет наблюдались и в отношении генотипа G1P[8]. Так, в 2012 г. циркуляция ротавирусов генотипа G1P[8] активизировалась, начиная со второй половины года, и увеличилась по сравнению с первой почти в три раза. На долю этого генотипа пришлось $8,3 \pm 3,4\%$ ротавирусных ОГЭ первой половины года и $23,5 \pm 5,2\%$ второй половины года. В 2013 г. ситуация изменилась, и вклад генотипа G1P[8] был прак-

тически равнозначен как в первой, так и во второй половинах года ($13,4 \pm 4\%$ и $9,6 \pm 5\%$ соответственно).

Генотип G9P[8] циркулировал в популяции ротавирусов только в течение нескольких месяцев (с января по май в 2012 г.; с ноября по февраль в 2013 г.). Так, в 2012 г. доля этого генотипа составила $10 \pm 5\%$ от всех генотипов, выявленных с января по май. В 2013 г. вклад генотипа G9P[8] возрос, составив $18,4 \pm 4\%$ от всех вирусов, зарегистрированных с ноября по февраль.

Генотип G3P[9] был идентифицирован только в 1 образце в апреле 2013 г.

Сравнение пейзажа ротавирусов 2012–2013 гг. с предыдущими годами показывает, что ротавирус G4P[8], являвшийся доминирующим в Республике Беларусь в 2008–2009 гг. и несколько

утративший свои позиции в 2010–2011 гг., в 2012–2013 гг. опять вышел на первое место в структуре заболеваемости. Удельный вес генотипа G3P[8], доминировавшего в 2011 г. ($66,7\%$) и занимавшего второе место по частоте выявления в 2012 г. ($21,5\%$), снизился до 2% в 2013 г. Доля генотипа G1P[8], который считается наиболее широко распространенным в мире, в 2012–2013 гг. в сравнении с 2011 г. несколько выросла (с $4,4\%$ до $12,3\%$ в 2012 г. и $12,2\%$ в 2013 г.), однако по-прежнему в Республике Беларусь удельный вес этого генотипа продолжает оставаться невысоким. Следует отметить, что ротавирусы генотипа G9P[8] встречаются в Республике Беларусь редко (по одному образцу было выявлено в 2008 и 2010 гг., 3 образца – в 2012 г., 7 образцов – 2013 г.), хотя частота обнаружения этого генотипа вируса в мире растет [13].

Заключение

Систематически проводимый в Республике Беларусь молекулярно-эпидемиологический мониторинг популяции ротавирусов позволяет определить спектр циркулирующих штаммов, выявить доминирующие генотипы, своевременно отслеживать их смену, осуществлять прогнозирование эпидемической ситуации.

Так, исследование генетического разнообразия циркулирующих в г. Минске ротавирусов, проведенное в 2012–2013 гг., показало, что в анализируемый период времени регистрировалось 6 генетических G-P-вариантов ротавируса, более 99% из которых составляли ротавирусы широко распространенных генотипов: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8]. При этом доминирующим генотипом на протяжении двух лет анализа являлся G4P[8], составивший от $55,4 \pm 6\%$ в 2012 г. до $69,3 \pm 5,5\%$ в 2013 г. и регистри-

руемый как в сезонный подъем ротавирусной инфекции, так и в межсезонный период. Далее по убывающей следовали комбинации G1P[8] ($12,3 \pm 2,6\%$), G3P[8] ($9,8 \pm 2,3\%$), G2P[4] ($6,7 \pm 1,9\%$), G9P[8] ($6,1 \pm 1,9\%$), G3P[9] ($0,6 \pm 0,5\%$).

Наряду с вышеперечисленными генотипами, которые удалось установить при помощи полугнездовой мультиплексной ОТ-ПЦР, был выявлен генотип, нетипируемый данным методом по белку VP4 (Р-тип). Исходя из этого, особый интерес представляет проведение секвенирования данного вируса, для того, чтобы определить, относится ли он к новому (или редко встречающемуся) генотипу, либо в процессе естественной эволюции вируса произошли нуклеотидные замены в анализируемом участке генома, не позволяющие типировать его с помощью применяемых нами праймеров.

Список использованных источников

1. Wilhelmi, I. Viruses causing gastroenteritis / I. Wilhelmi, E. Roman, A. Sanchez-Fauquier // Clin. Microbiol. Infect. – 2003. – Vol. 9 (4). – P. 247–262.
2. WHO estimates of the causes of death in children / J. Bryce [et al.] // Lancet. – 2005. – Vol. 365 (9465). – P. 1147–1152.
3. Global illness and deaths caused by Rotavirus / U. Parashar [et al.] // Emerg. Inf. Dis. – 2003. – Vol. 9. – № 2. – P. 565–540.
4. Burden of severe rotavirus disease in Australia / A.T. Newall [et al.] // J. Paediatr. Child Health. – 2006. – Vol. 42 (9). – P. 521–527.
5. Burden of rotavirus disease in European Union countries / M. Soriano-Gabarro [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. – 2006. – Vol. 25 (Supp. 1). – P. S7–S11.
6. Ротавирусная инфекция в Беларуси / В.Г. Гудков [и др.] // Здоровоохранение. – 2008. – № 11. – С. 8–13.
7. Ротавирусные гастроэнтериты у детей в г. Минске в 2012 г.: распространенность, сезонность, возрастное распределение,

генотипический пейзаж возбудителя / Е.О. Самойлович [и др.] // Медицинский журнал. – 2013 – № 4 – С. 95–98.

8. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis / M.K. Estes [et al.] // Novartis. Found. Symp. – 2001. – Vol. 238. – P. 82–96.

9. Jayaram, H. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication / H. Jayaram, M.K. Estes, B.V. Prasad // Virus Res. – 2004. – Vol. 101 (1). – P. 67–81.

10. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) / J. Matthijnssens // Archives of virology. – 2011. – P. 156, 1397–1413.

11. Iturriza-Gomara, M. Rotavirus genotypes

co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network / M. Iturriza-Gomara, T. Dallman, K. Banyai // Epidemiology and infection. – 2011. – P. 139, 895–909.

12. World Health Organization. Global Rotavirus Information and Surveillance Bulletin. – 2013. – Vol. 7. – P. 11

13. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction / J.R. Gentsch [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1992. – Vol. 30. – № 6. – P. 1365–1373.

14. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens / V. Gouvea [et al.] // J Clin Microbiol. – 1990. – Vol. 28. – P. 276–82.

Дата поступления статьи 24 апреля 2014 г.

Н.П. Митьковская¹, Т.В. Статкевич¹, С.С. Галицкая², Е.М. Балыш¹, А.С. Постоялко², Е.С. Смирнова¹,
А.А. Гусина³, Е.А. Сулимчик³

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ *ABCB1* И *CYP2C19* НА РАЗВИТИЕ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ КОРОНАРНЫХ СОБЫТИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ С ПОДЪЕМОМ СЕГМЕНТА ST, ПОДВЕРГШИХСЯ ЧРЕСКОЖНЫМ КОРОНАРНЫМ ВМЕШАТЕЛЬСТВАМ

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т. Дзержинского, 83

²ГУ «Республиканский клинический медицинский центр управления делами Президента РБ»

Республика Беларусь, 220030, г. Минск, ул. Красноармейская, 10

³ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66

Введение

В настоящее время достигнуты значительные успехи в лечении пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) с подъемом сегмента ST благодаря активному внедрению методов реперфузионной терапии – тромболитической терапии с применением современных тромболитических препаратов и чрескожных коронарных вмешательств (ЧКВ), т.е. методов, направленных на быстрое и максимально полное восстановление кровотока, что позволяет уменьшить размер инфаркта, улучшить исходы и прогноз.

Созданы многочисленные международные и национальные руководства и рекомендации по ведению пациентов с ОКС с подъемом сегмента ST, основывающиеся на результатах многоцентровых исследований [1, 2, 3].

Антитромбоцитарные препараты являются одними из важнейших лекарственных средств (ЛС), применяющихся для лечения и вторичной профилактики ишемической болезни сердца (ИБС) [4]. Для профилактики тромботических осложнений после ОКС и ЧКВ широко применяется комбинация клопидогрела и ацетилсалициловой кислоты. В исследовании CLARITY (Clopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy) была продемонстрирована эффективность добавления клопидогрела к тромболитическим препаратам и ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ОКС с подъемом сегмента ST в отношении снижения риска развития смерти от сердечно-сосудистых причин, повторного инфаркта миокарда или рецидивирующей ише-

мии, вызвавшей необходимость в экстренной реваскуляризации, на 20% [5]. Эффективность клопидогрела в лечении ИБС также была продемонстрирована в исследованиях CAPRIE (Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events), CURE (Clopidogrel in Unstable angina Recurrent Events), CREDO (Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation), COMMIT (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) [6–9].

В настоящее время получены данные о вариабельном ответе на клопидогрел у пациентов и о наличии феномена «резистентности» [10, 11].

Клопидогрел – пролекарство, всасывается в желудочно-кишечном тракте и, поступив в печень, метаболизируется при участии системы цитохрома-P450 до образования активного метаболита, который селективно и необратимо ингибирует связывание аденозиндифосфата (АДФ) с пуриновыми рецепторами тромбоцитов P2Y₁₂ [12].

После приема внутрь клопидогрел быстро абсорбируется в кишечнике. В процессе абсорбции участвует белок семейства АТФ-связывающих кассетных транспортеров – *ABCB1* (*MDR1*). Изменения в структуре гена *MDR1* могут приводить к изменению биодоступности клопидогрела. После абсорбции в кишечнике большая часть ЛС (85%) метаболизируется в печени в неактивный метаболит SR 26334 под воздействием карбоксилэстеразы-1. Оставшаяся часть (15%)

подвергается двухэтапной биотрансформации в печени при участии изоферментов системы цитохрома P-450 *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP3A5*. На первом этапе образуется 2-оксолопидогрел, на втором этапе – активный метаболит R130964. По данным исследований [13], наиболее важную роль в метаболизме клопидогрела играет ген *CYP2C19*. Данный ген характеризуется значительным генетическим полиморфизмом, что может служить причиной изменения фармакокинетики, фармакодинамики и клинической эффективности клопидогрела. Известно более 30 полиморфных вариантов (аллелей) гена *CYP2C19*, кодирующего одноименный изофермент. Так, носительство аллельного варианта *CYP2C19**1 обеспечивает полную ферментативную активность изофермента, т.е. обеспечивая нормальный метаболизм клопидогрела. *CYP2C19**2 и *CYP2C19**3 ассоциированы со снижением ферментативной активности цитохромов и возникновением резистентности к клопидогрелу. *CYP2C19**17 характеризуется повышением ферментативной активности *CYP2C19* и повышенным риском кровотечений при приеме стандартной дозы клопидогрела. Стоит отметить, что существуют межэтнические различия в носительстве мутантных аллелей *CYP2C19*. Так, носительство мутантных аллелей отмечено у 30–45% афроамериканцев, 20–30% представителей европеоидной расы, 50–65% жителей Восточной Азии [13].

Проведен ряд исследований по оценке влияния полиморфизма гена *CYP2C19* на клиническую эффективность и безопасность применения клопидогрела. В мета-анализе, проведенном Mega и соавт. [14], продемонстрировано повышение риска сердечно-сосудистой смерти, инфаркта миокарда или инсульта у носителей одной или двух му-

тантных аллелей *CYP2C19* по сравнению с носителями нормальных аллелей. Также продемонстрировано повышение риска тромбоза стента у носителей, по крайней мере, одной мутантной аллели.

На основании результатов исследований о снижении функциональной активности клопидогрела у лиц с полиморфизмами *CYP2C19**2, *CYP2C19**3, *CYP2C19**4 гена *CYP2C19*, в 2010 году Агентством по контролю за продуктами и лекарственными средствами США (FDA) была внесена информация в инструкцию по применению клопидогрела о снижении эффективности препарата у носителей функционально дефектных аллелей. В 2011 г. в Руководстве по ведению пациентов с ОКС с подъемом сегмента ST Европейского Общества Кардиологов (ESC) появился пункт о возможности генетического типирования *CYP2C19* при умеренном или высоком риске сердечно-сосудистых событий для выбора антиагрегантного препарата (уровень доказательности IIb) [15]. В Руководстве по чрескожным коронарным вмешательствам Американской ассоциации сердца (АНА) генетическое типирование *CYP2C19* оправдано у пациентов из группы риска тромбоза стента (уровень доказательности IIIc) [16].

Таким образом, особый интерес представляет изучение влияния носительства мутантных аллелей генов на эффективность клопидогрела у пациентов с ИБС, принимающих клопидогрел для лечения и вторичной профилактики сердечно-сосудистых осложнений.

Цель исследования: изучить влияние генетических полиморфизмов *ABCB1* и *CYP2C19* на развитие рецидивирующих коронарных событий у пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам.

Материалы и методы

В исследование включены 64 пациента с ОКС с подъемом сегмента ST, получивших в качестве реперфузионной терапии ЧКВ, в возрасте от 39 до 85 лет. В зависимости от развития рецидивирующих коронарных событий (РКС) были выделены две группы: с развившимися в течение инфаркта миокарда РКС (с высоким кардиоваскулярным риском, n = 32) и без такового (без РКС, группа срав-

нения, n = 32). В рамках РКС после проведения реперфузионной терапии рассматривали смерть, рецидив инфаркта миокарда, раннюю постинфарктную стенокардию, ретромбоз инфаркт-связанной артерии, в т.ч. тромбоз стента, острую левожелудочковую недостаточность.

Характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика исследуемых групп

Показатель	Группа с РКС, (n = 32)	Группа без РКС, (n=32)
Возраст, лет; $M \pm m$	61,59 $\pm$ 1,79	59,64 $\pm$ 1,43
Мужской пол, % (n)	84,4 (27)	87,5 (28)
Курение, % (n)	43,75 (14)	46,9 (15)
АГ, % (n)	87,5 (28)	84,4 (27)
Семейный анамнез ранней ИБС, % (n)	25 (8)	21,9 (7)
Сахарный диабет, % (n)	15,6 (5)	12,5 (4)
ИМТ, кг/м ² ; Me (25%; 75%)	29 (27,5; 33)	27,5 (25; 31)

Статистически значимых различий между группами пациентов по возрасту, полу и распространенности основных факторов сердечно-сосудистого риска не установлено.

Генетическое исследование включало качественную детекцию *in vitro* мутации в гене *ABCB1* (3435C>T) и четырех вариантов аллелей гена *CYP2C19* (*CYP2C19**2 (681G>A), *CYP2C19**3 (636G>A), *CYP2C19**4 (1A>G), *CYP2C19**5 (1297C>T)).

Для определения типа лекарственного метаболизма клопидогрела использовался набор реагентов Pronto ClopidoRisk (Pronto Diagnostics Ltd., Израиль). В этом наборе для идентификации мутации применяется метод амплификации и гибридизации с аллель специфичными олигонуклеотидами с последующей визуализацией продуктов гибридизации с помощью иммуноферментного анализа [17].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистических пакетов Statistica 10.0, Excel. Для того, чтобы определить правомочность использования в дальнейшем того или иного способа представления данных и статистического метода необходимо определение типов данных: качественные или количественные, а также является ли количественный признак дискретным или непрерывным. Качественные данные

представлены текстовыми значениями, которые автоматически кодируются числовыми значениями. Для описания количественных признаков проанализированы параметры распределения (соответствие вида распределения значений изучаемого признака закону нормального распределения), что регламентировало выбор способа описания центральной тенденции и рассеяния значений признака и выбор методов дальнейшего анализа данных. Применялся критерий Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения признака данные представлялись в виде среднего значения признака (M) и значения стандартной ошибки среднего значения (m). В случае распределения признака, отличного от нормального, данные представлялись в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала между 25-м и 75-м процентилями. Сравнение двух независимых групп по количественному признаку в случае распределения значений изучаемого признака по закону нормального распределения проводилось при помощи t-критерия Стьюдента. Для сравнения двух независимых групп, не соответствующих закону нормального распределения, использовали критерий Манна-Уитни. Для сравнения групп по качественному признаку использовали тест χ^2 . Различия в группах считали значимыми при вероятности безошибочного прогноза 95,5% ($p < 0,05$) [18].

Результаты и обсуждение

При генотипировании по гену *ABCB1* в группе пациентов с РКС выявлено 6,25% пациентов ($n = 2$) с аллелью ТТ гена *ABCB1* (гомозиготы), в группе пациентов без РКС не выявлено носителей данного генотипа.

Носительство генотипа СТ (гетерозиготы) выявлено у 93,75% пациентов с РКС, а в группе пациентов без РКС частота встречаемости генотипа СТ составила 81,25% ($\chi^2 = 6,6$, $p < 0,01$).

В работе S. Tabassome была выявлена ассоциация полиморфизма *C3435T* гена *ABCB1* с клинической резистентностью к клопидогрелу у 2 208 пациентов с инфарктом миокарда, получавших клопидогрел и находившихся под наблюдением в течение года. Носители генотипа ТТ имели большую частоту сердечно-сосудистых событий, чем носители генотипа СС [19]. В исследовании Simon T. соавт. было показано, что пациенты с аллелью ТТ гена *ABCB1* имеют большее количество событий (смерть, инфаркт миокарда, инсульт) в течение

1 года, чем пациенты с генотипом СС (15,5% против 10,7%) [20]. Также данное исследование показало, что наличие любой из двух аллелей *CYP2C19* (*2,*3,*4 или *5) со сниженной функцией и, как минимум, одной вариантной аллели *ABCB1* ассоциировалось с высоким риском первичных сердечно-сосудистых событий, в то время как изолированное носительство вариантной аллели *ABCB1* не оказывало влияния.

Данные, полученные в ходе генотипирования по *CYP2C19* в нашем исследовании представлены в табл. 2.

Таблица 2

Частота гетерозиготных генотипов *CYP2C19* среди пациентов с ОКС с подъемом сегмента ST, подвергшихся ЧКВ

Генотип	Пациенты с РКС (n=32)		Пациенты без РКС (n=32)	
	Количество пациентов, n	% от общего количества	Количество пациентов, n	% от общего количества
*1/*2	12	37,5	2	6,25
*1/*3	2	6,25	—	—
*1/*4	1	3,125	—	—
*1/*5	—	—	—	—

Таким образом, выявлены статически значимые различия по носительству, по крайней мере, одной мутантной аллели *CYP2C19**2 (*1/*2) среди пациентов с РКС (37,5%) по сравнению с группой пациентов без РКС (6,25%), $\chi^2 = 9,1$, $p < 0,01$. Т.е. у пациентов с выявленными мутантными аллелями *CYP2C19* мы можем ожидать недостаточную клиническую эффективность клопидогрела при назначении его в стандартной дозе. Возможно, развитие РКС в выделенной группе пациентов отчасти связано с нарушением метаболизма клопидогрела и его недостаточной клинической эффективностью. Несмотря на активно проводимые исследования по влиянию полиморфизма гена *CYP2C19* на развитие неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, остается ряд нерешенных вопросов. Основные касаются коррекции антиагрегантной терапии клопидогрелом у носителей мутантных аллелей гена *CYP2C19* и экономической эффективности проведения фармакогенетического тестирования. В случае выявления аллелей, ассоциированных с риском тромботических осложнений

(*CYP2C19**2 или *CYP2C19**3), возможны следующие варианты коррекции антиагрегантной терапии: 1) увеличение дозы клопидогрела, 2) назначение других ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов (prasugrel, ticagrelor), 3) добавление антиагрегантной терапии ингибиторов гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов IIb/IIIa [21]. Однако увеличение дозы клопидогрела требует проведения исследований, оценивающих долгосрочную эффективность и безопасность такой терапии, также необходимо сравнение клинической и экономической эффективности замены клопидогрела на другие ЛС. В связи с этим, вопрос остается открытым и требует дальнейшего изучения. Проблема экономической эффективности проведения предварительного фармакогенетического тестирования для выбора антитромбоцитарного препарата, изучалась в исследовании Reese и соавт. [22] Антиагрегантная терапия, основанная на результатах генотипирования по *CYP2C19*, оказалась менее дорогостоящей, чем назначение клопидогрела или prasugrel без предварительного генотипирования.

Заключение

Антиагрегантная эффективность клопидогрела зависит от полиморфизмов генов, участвующих в его метаболизме. В группе пациентов с развитием рецидивирующих коронарных событий в остром периоде инфаркта миокарда частота встречаемости генотипа ТТ гена *ABCB1* составила 6,25%, генотипа СТ гена *ABCB1* – 93,75%, тогда как в группе пациентов с неосложненным течением инфаркта

миокарда носителей генотипа ТТ не обнаружено, а удельный вес гетерозигот (генотипа СТ) составил 81,25%. Частота встречаемости генотипа *CYP2C19**2 (*1/*2) у пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, течение которого осложнилось развитием рецидивирующих коронарных событий, и с неосложненным течением заболевания составила 37,5% и 6,25% соответственно.

Список использованных источников

1. ACCF/AHA/SCAI guideline for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions / G.N. Levine [et al.] // J Am Coll Cardiol. – 2011. – Vol. 58. – P. 2550–2583.
2. ACCF/SCAI/STS/AATS/AHA/ASNC/HFSA/SCCT 2012 appropriate use criteria for coronary revascularization focused update / M.R. Patel [et al.] // J. Thorac Cardiovasc Surg. – 2012. – 143. – P. 780–803.
3. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation / Ph. Gabriel Steg [et al.] // European Heart Journal. – 2012. – Vol. 33. – P. 2569–2619.
4. Antithrombotic Trialists' Collaborative metaanalysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. BMJ. – 2002. – Vol. 324. – P. 71–86.
5. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation / M.S. Sabatine [et al.] // N Engl J Med. – 2005. – Vol. 352 (12). – P. 1179–1189.
6. Benefits and risks of the combination of clopidogrel and aspirin in patients undergoing surgical revascularization for non-ST-elevation acute coronary syndrome: the Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events (CURE) Trial / K.A. Fox [et al.] // Circulation. – 2004. – 110(10). – P. 1202–1208.
7. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial / S.R. Steinhubl [et al.] // JAMA. – 2002. – 288 (19). – P. 2411–2420.
8. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement / I. Muller [et al.] // Thromb Haemost. 2003. – Vol. 89. – P. 783–787.
9. Addition of clopidogrel to aspirin in 4585 patients with acute myocardial infarction: randomized placebo-controlled trial / Z.M. Chen [et al.] // Lancet. – 2005. – Vol. 366. – P. 1607–1621.
10. Variability in individual responsiveness to clopidogrel. Clinical implications, management and future perspectives / D. Angiolillo [et al.] // J Am Coll Cardiol. – 2007. – Vol. 49. – P. 1505–1516.
11. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation / T. Geisler [et al.] // Eur Heart J. – 2006. – Vol. 27. – P. 2420–2425.
12. Мешков, А.Н. Фармакогенетика клопидогрела // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2010. – Т. 6 (4). – С. 569–572.
13. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel / J.L. Mega [et al.] // N Engl J Med. – 2009. – Vol. 360. – P. 354–362.
14. Reduced function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis / J.L. Mega [et al.] // JAMA. – 2010. – Vol. 304 (16). – P. 1821–1830.
15. ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation / P.G. Steg [et al.] // Eur Heart J. 2012. – Vol. 33 (20). – P. 2569–2619.
16. ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention / G.N. Levine [et al.] // JACC. – 2011. – Vol. 58(24). – P. 44–122.
17. Pronto ThromboRisk a novel primer-extension ELISA based assay for the detection of mutations associated with increased risk for

thrombophilia./ N. Carmi [et al.]// J. Clin Lab Anal. – 2004. – Vol. 18 (5) – P. 259–264.

18. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA/О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.

19. Genetic Determinants of Response to Clopidogrel and Cardiovascular Events / S. Tabassome [et al.] // N Engl J Med 2009. – P. 360,363–375.

20. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events / T. Simon [et al.] //

N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 360. – P. 363–375.

21. Значение фармакогенетического тестирования по *CYP2C19* для персонализации применения антиагрегантов в кардиологической практике / К.Б. Мирзаев [и др.] Рациональная фармакотерапия в кардиологии // 2013. – Т. 9 (4). – С.404–408.

22. Cost-effectiveness of cytochrome P450 2C19 genotype screening for selection of antiplatelet therapy with clopidogrel or prasugrel / E.S. Reese [et al.] // Pharmacotherapy. – 2012. – Vol. 32 (4). – P. 323–332.

Дата поступления статьи 29 апреля 2014 г.

Н.П. Митьковская¹, Т.В. Статкевич¹, Е.М. Балыш¹, А.А. Гусина², И.В. Патеюк¹, Л.В. Картун¹, Е.А. Сулимчик²

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ (*C677T*) У ПАЦИЕНТОВ С КРУПНООЧАГОВЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА И РЕЦИДИВИРУЮЩИМИ КОРОНАРНЫМИ СОБЫТИЯМИ

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т. Дзержинского, 83

²ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66

Введение

Развитие атеросклероза является полиэтиологическим процессом, в котором клинические проявления детерминируются средовыми и генетическими факторами. В дополнение к классическим факторам риска атеросклероза (артериальная гипертензия, дислипидемия, сахарный диабет и курение) клинические проявления могут быть обусловлены вариантами энзимов, участвующих в обеспечении эндотелиальной функции и синтезе протромботических факторов [1].

В настоящее время активно изучается прогностическая значимость полиморфизмов генов, кодирующих различные классы белков, участвующих в патогенезе атеросклероза (*C*-реактивного белка [2], интерлейкина-6 [3, 4], металлопротеиназы-1 и -12 [5], металлопротеиназы-3 и -9 [6], липопротеинов [7], фактора некроза опухоли-альфа [8] и т.д.). Генотипы *G-1607GG* металлопротеиназы – 1 и *A-82G*, *A1082G* металлопротеиназы -12 ассоциированы с развитием рестеноза и значимых клинических событий [5]. Выявлена взаимосвязь между полиморфизмом гена, кодирующего синтез интерлейкина-6, и развитием инфаркта миокарда (ИМ) [3, 4].

Учитывая тесную взаимосвязь процессов атерогенеза и тромбообразования, особое внимание привлекает полиморфизм генов системы гемостаза. На сегодняшний день доказана связь некоторых из них (в первую очередь – мутации фактора V Лейден и полиморфизма гена протромбина) с возникновением венозных тромбозов и эмболий, а также системных тромбоэмболических осложнений мерцательной аритмии [9, 10]. На популяции 248 пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) выявлена ассоциация генетического полимор-

физма ингибитора тромбин-активированного фибринолиза *C+1542G* и *Thr325/Ile* с развитием у их носителей ОКС с подъемом сегмента ST [11]. По результатам изучения полиморфизма гена, кодирующего синтез ингибитора активатора плазминогена-1, получены данные об ассоциации 4G аллели гена с развитием ИМ у молодых пациентов [12]. Имеются данные о взаимосвязи полиморфизма рецепторов GPIIb/IIIa тромбоцитов с вероятностью развития будущих кардиоваскулярных событий [13].

По данным исследования, включившего 503 больных (387 мужчин и 116 женщин), средний возраст которых составил 59,4 лет помимо совокупности клинических факторов риска (наличие стенокардии II–III функционального класса и постинфарктного кардиосклероза, поражение трех основных коронарных артерий либо ствола левой коронарной артерии, сопутствующие проявления атеротромбоза в церебральном и периферическом сосудистых бассейнах, высокая масса тела (индекс массы тела (ИМТ) $\geq 31,6$ кг/м²), нарушение функции почек (клиренс креатинина < 67 мл/мин) и анамнез эрозивного гастрита независимым влиянием на прогноз обладают такие генетические показатели, как носительство некоторых вариантов генов, кодирующих синтез белков цикла реметилирования гомоцистеина *TCN 776 CC*, а также *MTHFR C667 TT/CT* и *1298 AA* [14].

Метилентетрагидрофолатредуктаза (*MTHFR*) играет ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. Фермент катализирует восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат. Последний является активной формой фолиевой кислоты, необходимой для образования метионина из гомоцистеина и

далее S-аденозилметионина, играющего ключевую роль в процессе метилирования ДНК. Ген *MTHFR* локализован на хромосоме 1p36.3. Известно около двух десятков мутаций этого гена, нарушающих функцию фермента. Наиболее изученной мутацией является вариант, в котором нуклеотид цитозин (С) в позиции 677 заменен тимидином (Т). Такой полиморфизм *MTHFR* обозначается как мутация *C677T*. У лиц, гомозиготных по данной мутации (генотип Т/Т), отмечается термолабильность *MTHFR* и снижение активности фермента примерно до 35% от среднего значения, что проявляется повышением концентрации гомоцистеина в сыворотке крови на 20% [15, 16]. Мутация *677T* гена *MTHFR* распространена достаточно широко: около 10% в популяции являются мутантными гомозиготами (ТТ), 47% – неизменными гомозиготами (СС) и 43% – гетерозиготами (СТ) [15]. Однако распространенность данной мутации различается в разных этнических когортах. Так, удельный вес носителей мутантной гомозиготы *MTHFR 677TT* в популяции американцев – выходцев из Африки – ниже, чем в европейской популяции (1,3% и 12,8% соответственно) [16].

В исследовании, включившем 271 пациента с ИМ и 141 здорового индивида в возрасте до 45 лет, получены данные о более высоком

риске атеросклероза у носителей мутантной аллели *MTHFR*. Исследователи выявили, что носительство полиморфных аллелей *C677T MTHFR* оказывает значимое влияние на формирование атеросклеротических бляшек [17].

При изучении полиморфизма гена *MTHFR* у 384 здоровых лиц, 260 пациентов с сахарным диабетом (СД) и 348 пациентов с атеросклерозом без сахарного диабета выявлено, что у носителей мутантной аллели *MTHFR C677T* достоверно чаще в анамнезе был предшествующий ИМ [1].

Мета-анализ 30 исследований, включивших 8,140 пациентов с ИМ и 10,522 здоровых лиц, показал, что полиморфизм *MTHFR C677T* ассоциирован с риском развития ИМ у европейцев молодого и зрелого возраста [18].

У пациентов с острым ИМ персистирующая окклюзия инфаркт-связанной артерии после реперфузии связана с неблагоприятным прогнозом. Гомозиготное носительство *MTHFR 677TT* независимо ассоциировано с персистирующей окклюзией инфаркт-связанной артерии после тромболитической терапии (ТЛТ) [19].

Цель работы: изучить распространенность полиморфизма *C677T* гена *5,10-MTHFR* у пациентов с острым крупноочаговым инфарктом миокарда, течение которого осложнилось развитием рецидивирующих коронарных событий.

Материалы и методы

В исследование были включены 92 пациента в возрасте от 35 до 78 лет с острым крупноочаговым ИМ, получившие в качестве реперфузионной терапии тромболизис.

Эффективность ТЛТ оценивалась с использованием неинвазивных (электрокардиографических, клинических и лабораторных) и инвазивных (градиция кровотока ТИМІ по данным коронароангиографии) критериев. Неинвазивные маркеры эффективного тромболизиса оценивались через 90 минут и включали снижение сегмента ST более чем на 50% в отведении с максимальным подъемом, раннее многократное увеличение уровня кардиоспецифических ферментов (МВ-КФК, миоглобин, тропонин), значительное уменьшение интенсивности либо исчезновение болевого синдрома, появление реперфузионных аритмий.

В зависимости от развития рецидивирующих коронарных событий (РКС) были сформированы 2 группы: с РКС (основная группа,

n = 45) и без РКС (группа сравнения, n = 47). В качестве РКС после проведения реперфузионной терапии рассматривались рецидивирующий ИМ, ранняя постинфарктная стенокардия, ретромбоз инфаркт-связанной артерии.

Использованы клинические, антропометрические, лабораторные, инструментальные и статистические методы исследования.

Пациентам проводилось измерение антропометрических показателей (определение роста и веса). Для выявления нарушений жирового обмена использовалось вычисление ИМТ.

Проводился расчет значения ИМТ (индекса Кетле) по формуле:

$$\text{ИМТ} = \text{Вес (кг)} / \text{Рост}^2 (\text{м}^2)$$

Инструментальное исследование сердечно-сосудистой системы включало использование электрокардиографии, проведение ультразвукового исследования сердца, селективной рент-

геноконтрастной коронароангиографии (КАГ). Электрокардиографическое исследование проводилось при первичном медицинском контакте и через 90 мин после тромболизиса. Ультразвуковое исследование сердца проводилось в 1–2-е сутки заболевания в трех режимах: М-, В-модальном и цветном доплеровском.

Лабораторные методы исследования включали проведение общеклинического анализа крови при поступлении в стационар, определение уровня гликемии, кардиоспецифических ферментов, показателей системы гемостаза, эндотелиальной дисфункции, провоспалительных цитокинов, липидного спектра крови. Концентрацию гомоцистеина определяли в плазме крови иммуноферментным методом с использованием набора DRG International, Inc. (США).

Для детекции мутации *C677T* в гене *5,10-MTHFR* использовали набор Pronto ThromboRisk™ (Pronto Diagnostics Ltd., Израиль). В этом наборе для идентификации мутации применяется метод амплификации и гибридизации с аллель-специфичными олигонуклеотидами с последующей визуализацией продуктов гибридизации с помощью иммуноферментного анализа [20].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистических пакетов Statistica 10.0, Excel. Для того, чтобы определить правомочность использования в дальнейшем того или иного способа представления данных и статистического метода необходимо определение типов данных: качественные или

количественные, а также является ли количественный признак дискретным или непрерывным. Качественные данные представлены текстовыми значениями, которые автоматически кодируются числовыми значениями. Для описания количественных признаков проанализированы параметры распределения (соответствие вида распределения значений изучаемого признака закону нормального распределения), что регламентировало выбор способа описания центральной тенденции и рассеяния значений признака и выбор методов дальнейшего анализа данных. Применялся критерий Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения признака данные представлялись в виде среднего значения признака (M) и значения стандартной ошибки среднего значения (m). В случае распределения признака, отличного от нормального, данные представлялись в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала между 25-м и 75-м процентилем. Сравнение двух независимых групп по количественному признаку в случае распределения значений изучаемого признака по закону нормального распределения проводилось при помощи t -критерия Стьюдента. Для сравнения двух независимых групп, не соответствующих закону нормального распределения, использовали критерий Манна-Уитни. Для сравнения групп по качественному признаку использовали тест χ^2 . Различия в группах считали значимыми при вероятности безошибочного прогноза 95,5% ($p < 0,05$) [21].

Результаты и обсуждение

При изучении основных кардиоваскулярных факторов риска в группе пациентов с РКС выявлен

большой удельный вес курильщиков и лиц с сахарным диабетом, чем в группе сравнения (см. табл).

Таблица

Характеристика исследуемых групп

Показатель	Группа с РКС, (n=45)	Группа без РКС, (n=47)
Возраст, лет; $M \pm m$	56,31 $\pm$ 1,67	57,7 $\pm$ 1,93
Мужской пол, % (n)	93,33 (42)	82,98 (39)
Курение, % (n)	68,89 (31) *	40,43 (19)
АГ, % (n)	84,44 (38)	89,36 (42)
Семейный анамнез ранней ИБС, % (n)	11,11 (5)	6,38 (3)
Сахарный диабет, % (n)	24,44 (11) *	8,51 (4)
ИМТ, кг/м ² ; Me (25%;75%)	28,73 (26,17;32,02)	27,17 (24,22;31,24)
Общий холестерол, ммоль/л; $M \pm m$	4,7 (4,31;5,2)	4,5 (4,0;5,1)

* – достоверность различия показателей при сравнении с группой без РКС при $p < 0,05$.

Курение является одним из неблагоприятных факторов, способствующих ускоренному развитию атеротромбоза. Существует мнение, что у курильщиков активация свертывающей системы и тромбообразование имеют основное значение в патогенезе ИМ, таким образом ТЛТ будет особенно эффективна у этой категории пациентов. Косвенно это предположение подтверждает тот факт, что у курящих намного чаще удается полностью восстановить коронарный кровоток (TIMI 3) [22]. Определены предикторы госпитальной летальности или реинфаркта, такие как возраст, класс острой сердечной недостаточности по Killip, уровень систолического и диастолического артериального давления, частота сердечных сокращений, передняя локализация ИМ, статус курения, предшествующий ИМ, пол, проживание в сельской местности [23]. Шкала риска TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infarction), которая используется для прогнозирования кардиоваскулярных событий как в период до 30 дней, так и в течение 1 года после ОКС, включает 7 независимых клинических предикторов:

1) возраст старше 65 лет; 2) наличие ≥ 3 сердечно-сосудистых факторов риска (отягощенная наследственность по КБС, СД, артериальная гипертензия, гиперхолестеринемия); 3) стенозы $>50\%$ при КАГ; 4) тяжелая стенокардия (2 эпизода за последние 24 ч); 5) применение аспирина в течение последних 7 суток; 6) смещение сегмента ST $> 0,05$ мВ; 7) повышенный уровень маркеров некроза [24].

Временной интервал от появления симптомов до начала реперфузионной терапии в группах пациентов с и без РКС достоверно не различался (2,25 (2,0;3,5) и 2,0 (1,5;3,5) часов соответственно).

При изучении структуры использованных тромболитических препаратов в группах пациентов с и без РКС достоверных различий не выявлено (стрептокиназа – 13,33% (n = 6) и 12,77% (n = 6) соответственно, $\chi^2 = 0,0$, $p > 0,05$, альтеплаза – 8,89% (n = 4) и 14,89% (n = 7) соответственно, $\chi^2 = 0,8$, $p > 0,05$, тенектеплаза – 77,78% (n = 35) и 72,34% (n = 34) соответственно, $\chi^2 = 0,4$, $p > 0,05$). Данные представлены на рис. 1.

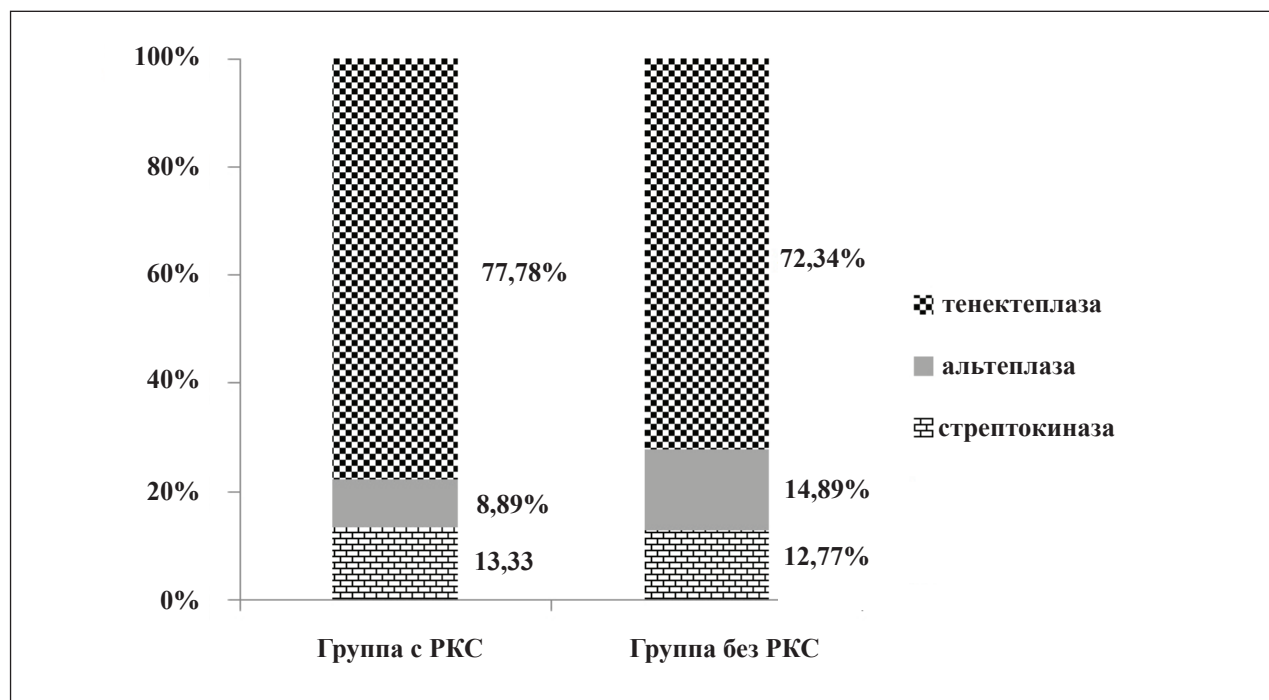


Рис. 1. Структура использованных тромболитических препаратов в исследуемых группах

Согласно полученным нами данным, у пациентов с острым крупноочаговым ИМ, включенных в исследование, удельный вес носителей двух полиморфных аллелей (гено-

тип *MTHFR* 667 TT) составил 14,58%, одной полиморфной аллели (генотип *MTHFR* 667 CT) – 62,5% и генотипа *MTHFR* 667 CC – 22,92%. Эти данные не противоречат резуль-

татам исследования Gábor Viktor Szabó, посвященного изучению распространенности данного генетического полиморфизма среди пациентов с атеросклерозом и с и без СД. По данным автора, гетерозиготное носительство *MTHFR C677T* встречалось в контрольной группе у 32% исследуемых, тогда как среди пациентов с СД и ИМ этот показатель составил 53,5%, а среди пациентов с ИМ без СД – 55,1%. Частота гомозиготного носительства мутантной аллели *TT* составила у пациентов

с СД и ИМ 16,8%, а в группе пациентов с ИМ без СД – 21,2% [1].

При изучении распространенности полиморфизма *C677T* гена 5,10- *MTHFR* у пациентов с острым крупноочаговым ИМ в зависимости от развития РКС нами выявлено, что частота носительства генотипа *MTHFR 667 TT* в группе пациентов с РКС была достоверно выше, чем в группе с неосложненным течением заболевания (31,58% и 3,45% соответственно, $\chi^2 = 7,3$, $p < 0,01$, рис. 2).

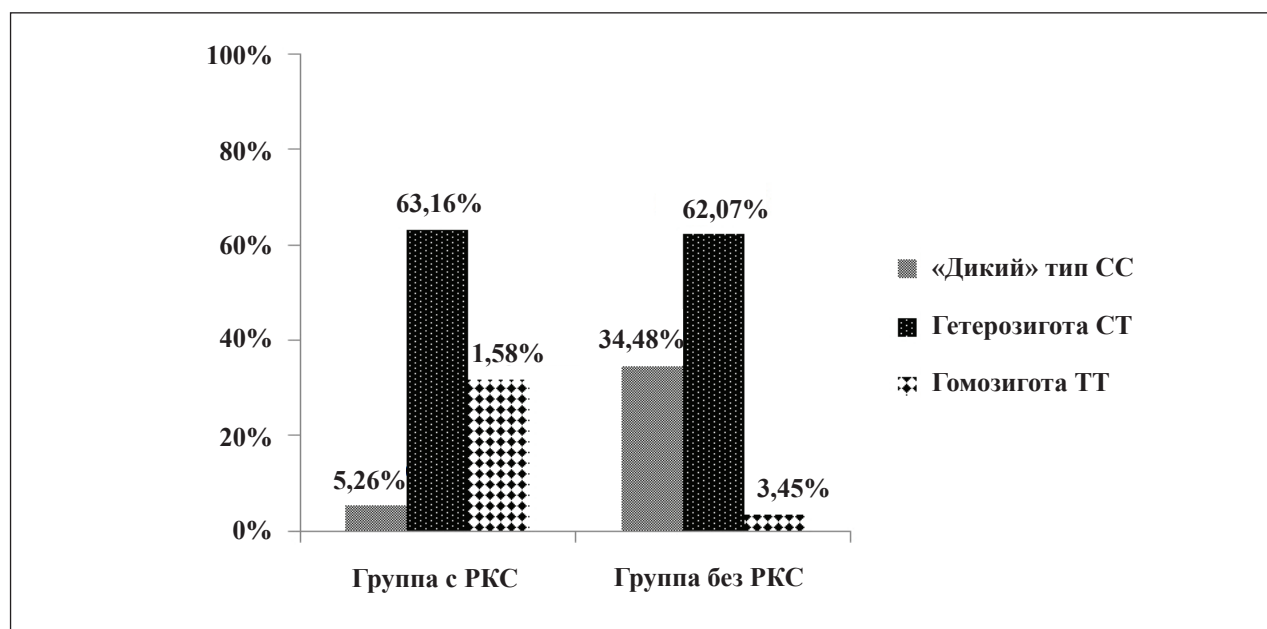


Рис. 2. Распространенность полиморфизма *C677T* гена 5,10-*MTHFR* в исследуемых группах

По имеющимся данным, мутация *677C>T* в гене *MTHFR* ведет к снижению функциональной активности белка МТНФР, что выражается в повышенном уровне гомоцистеина плазмы крови [15, 16, 25–27]. Повышенный уровень гомоцистеина является серьезным предиктором смертности лиц с предшествующими сердечно-сосудистыми заболеваниями или выявленными другими факторами риска. У больных с гипергомоцистеинемией

после системного тромболизиса в 2,6 раз чаще отмечается развитие рецидивирующих расстройств коронарного кровообращения [28, 29]. При изучении концентрации гомоцистеина в сыворотке крови получены данные о достоверно более высоких среднегрупповых значениях этого показателя у пациентов с РКС, чем в группе сравнения (20,0 (17,5;27,0) и 17,5(15,0;21,0) мкмоль/л соответственно, $p < 0,05$).

Заключение

Гомозиготное носительство двух полиморфных аллелей (генотип *MTHFR 667TT*) достоверно более часто выявлялось в группе пациентов с крупноочаговым инфарктом миокарда, осложнившимся развитием рецидивирующих коронарных событий, чем у лиц с неосложненным течением заболевания. Уровень гомоци-

стеинемии у пациентов с рецидивирующими коронарными событиями был выше, чем в группе сравнения, что может быть связано не только с влиянием средовых факторов, но и с функциональной несостоятельностью белка метилентетрагидрофолатредуктазы вследствие наличия мутации *677C>T*.

Список использованных источников

1. Szabó, V. The role and importance of gene polymorphisms in the development of atherosclerosis / V. Szabó // *Interv Med Appl Sci.* – 2013. – Vol. 5 (1). – P. 46–51.
2. Prognostic value of levels of brain natriuretic peptide and genetic factors in patients after acute coronary syndrome/ M.A. Evdokimova [et al.] // *Kardiologiya.* – 2011. – Vol. 51 (2) P. 26–33.
3. Genetic polymorphism of interleukin-6 gene and susceptibility to acute myocardial infarction./ H. Vakili [et al.] // *Coron Artery Dis.* – 2011. – Vol. 22 (5) – P. 299–305.
4. Mälarstig, A. Genetic variation in the interleukin-6 gene in relation to risk and outcomes in acute coronary syndrome / A. Mälarstig, L. Wallentin, A. Siegbahn // *Thromb Res.* – 2007 – Vol. 119 (4) – P. 467–473.
5. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the outcome of coronary artery disease / I. Jguirim-Souissi [et al.] // *Coron Artery Dis.* – 2011. – Vol. 22 (6) – P. 388–393.
6. Polymorphisms of matrix metalloproteinases in myocardial infarction: a meta-analysis / J. Wang [et al.] // *Heart* – 2011 – Vol. 97 – P. 1542–1546.
7. Transcriptional fingerprint of human whole blood at the site of coronary occlusion in acute-myocardial infarction / O. Muller [et al.] // *EuroIntervention.* – 2011 – Vol. 7 (4) – P. 458–466
8. Tumor necrosis factor-alpha gene -308G>A polymorphism is associated with ST-elevation myocardial infarction and with high plasma levels of biochemical ischemia markers / Antonicelli R [et al.] // *Coron Artery Dis.* – 2005 – Vol. 16 (8) – P. 489–493.
9. Prothrombotic polymorphisms and long-term prognosis of patients with stable ischemic heart disease / A.L. Komarov [et al.] // *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии* – 2011. – № 7 (4) – С. 409–425.
10. Analysis of polymorphisms Leiden Factor V G1691A and prothrombin G20210A as risk factors for acute myocardial infarction./ G.I. Forte [et al.] // *Biogerontology.* – 2011. – Vol. 12 (5) – P. 485–490.
11. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor genetic polymorphisms as markers of the type of acute coronary syndrome./ D. Tàssies [et al.] // *Thromb Res.* – 2009 – 124(5) – P. 614–8.
12. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients / I. Isordia-Salas [et al.] // *Rev Esp Cardiol.* – 2009 – Vol. 62 (4) – P. 365–372.
13. Platelet glycoprotein IIb HPA-3 polymorphism and acute coronary syndromes / J. Lekakis [et al.] // *Int J Cardiol.* – 2008 – Vol. 127 (1) – P. 46–50.
14. Prothrombotic polymorphisms and long-term prognosis of patients with stable ischemic heart disease/ A.L. Komarov [et al.] // *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии.* – 2011. – № 7 (4) – С. 409–425.
15. Wald, D.S. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis / D.S. Wald, M. Law, J.K. Morris // *BMJ* – 2002. – Vol. 325 (7374). – P. 1202.
16. Polygenic Association with Total Homocysteine in the Post Folic Acid Fortification Era: the CARDIA Study/ M.Y. Tsai [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2009. – Vol. 98 (1–2) – P. 181–186.
17. Genetic Polymorphisms and the Risk of Myocardial Infarction in Patients Under 45 Years of Age / A. Sakowicz [et al.] // *Biochem Genet.* – 2013. – Vol. 51 (3–4) – P. 230–242.
18. Association between polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T and risk of myocardial infarction: a meta-analysis for 8,140 cases and 10,522 controls / C. Xuan [et al.] // *Arch. Med. Res.* – 2011. – Vol. 42 (8) – P. 677–685.
19. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T genetic polymorphism and late infarct-related coronary artery patency after thrombolysis/ G. Patti [et al.] // *J. Thromb. Thrombolysis.* – 2009. – Vol. 27 (4) – P. 413–420.
20. Pronto ThromboRisk – a novel primer-extension ELISA based assay for the detection of mutations associated with increased risk for thrombophilia / N. Carmi [et al.] // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2004. – Vol. 18 (5) – P. 259–264.
21. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
22. Шахнович, Р.М. Острый коронарный синдром с подъемом сегмента ST: руководство для врачей / Р.М. Шахнович. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 376 с.

23. Early reinfarction after fibrinolysis: experience from the global utilization of streptokinase and tissue plasminogen activator (alteplase) for occluded coronary arteries (GUSTO I) and global use of strategies to open occluded coronary arteries (GUSTO III) trials / M.P. Hudson [et al.] // *Circulation*. – 2001. – Vol. 104 (11). – P. 1229–1235.
24. TIMI Risk Score accurately predicts risk of death in 30-day and one-year follow-up in STEMI patients treated with primary percutaneous coronary interventions / A. Kozieradzka [et al.] // *Kardiol Pol.* – 2007. – Vol. 65 (7). – P. 788–795.
25. *MTHFR* 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis / M. Klerk [et al.] // *JAMA*. – 2002. – Vol. 288 (16) – P. 2023–2031.
26. Biological and clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism / P.M. Ueland [et al.] // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2001. – Vol. 22(4) – P. 195–201.
27. Peripheral arterial disease and methylene-tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T mutations: A case-control study and meta-analysis / N. Khandanpour [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2009. – Vol. 49 (3) – P. 711–718.
28. Михайлова, К.В. Влияние гипергомоцистеинемии на нарушения внутрисосудистого свертывания крови и клиническое течение инфаркта миокарда: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.06 / К.В. Михайлова. – М., 2008. – 143 с.
29. Лебедева, А.Ю. Клинические, биохимические и инструментальные аспекты прогнозирования течения инфаркта миокарда после тромболитической терапии: автореф. дис. ... д-р мед. наук: 14.00.06 / А.Ю. Лебедева. – М., 2009. – 228 с.

Дата поступления статьи 29 апреля 2014 г.

ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА НА ВЫЗВАННОЕ СТРЕССОМ ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РАННЕГО ОТВЕТА *C-FOS* И *C-JUN* В МИОКАРДЕ КРЫС

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»
Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 23

Введение

Установлено, что члены мультигенного семейства генов раннего ответа – *c-fos* и *c-jun* – вовлечены во внутриклеточные стресс-индуцированные каскады передачи сигналов, поэтому представляют собой «удобную» модель для изучения изменения экспрессии генов, вызванного действием стрессоров [1]. Известно, что важная роль в регуляции этого процесса в нормальных условиях принадлежит йодсодержащим тиреоидным гормонам (ЙТГ) за счет связывания трийодтиронина с ядерными рецепторами тиреоидных гормонов – TR α 1 и TR β 1, находящимися в специфических элементах ответа (Thyroid hormone Response Elements (TREs)), расположенных

в промоторных областях генов-мишеней [2]. Вместе с тем, доказано существенное значение ЙТГ в антистресс-системе организма, реализующееся за счет стимуляции локальных стресс-лимитирующих систем: повышения активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) (КФ 1.15.1.1) и каталазы (КАТ) (КФ 1.11.1.6) [3], уровня белков теплового шока (HSP 70) [4], циклических нуклеотидов [5], простагландинов [6]. Однако влияние ЙТГ на экспрессию генов раннего ответа при стрессе до сих пор не изучено.

Цель работы – исследовать воздействие ЙТГ на стресс-индуцированную экспрессию генов *c-fos* и *c-jun* в миокарде животных.

Материалы и методы

Работа выполнена на 78 беспородных крысах-самцах массой 200–250 г. Физический стресс воспроизводили путем экспозиции крыс холодом в термостатируемой камере (t 4–5 °C) в течение 30 мин, химический – введением этанола (однократно внутрижелудочно 25% раствор в дозе 3,5 г/кг массы тела), эмоциональный – с помощью методики «свободного плавания животных в клетке» (СПК), для чего крыс по 5 особей помещали в стандартную клетку, заполненную водой (t 22 °C) на 15 см и закрытую сверху сеткой, на 30 мин [7].

Мерказолил вводили в дозе 25 мг/кг в течение 20 суток, L-тироксин – в дозах от 1,5 до 3,0 мкг/кг в течение 28 суток внутрижелудочно в 1% крахмальном клейстере. Крысы контрольной группы, как и подвергнутые затем стрессу без применения препаратов, получали крахмальный клейстер таким же образом.

Каждая экспериментальная группа состояла из 6 особей. Животных умерщвляли декапитацией под уретановым наркозом (1 г/кг мас-

сы тела) тотчас же после прекращения процедуры стрессирования в случае холодового воздействия и СПК и через 30 минут – после введения алкоголя.

Концентрацию тиреотропного гормона (ТТГ), общих трийодтиронина (Т₃), тироксина (Т₄), их свободных фракций (Т₃ св и Т₄ св) в крови исследовали радиоиммунологическим методом, используя наборы реактивов ИРМА-ТТГ-СТ, РИА-Т3-СТ, РИА-Т4-СТ (Институт биоорганической химии НАН Беларуси), РИА FT3, РИА FT4 (IMMUNOTECH, A Beckman Coulter Company, Чехия).

Выделение тотальной РНК из замороженных в жидком азоте образцов сердец крыс проводилось на спин-колонках с помощью наборов реагентов RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколам, предложенным производителем набора. Измельчение образцов (35–50 мг) проводилось в 600 мкл лизирующего RLT-буфера (RNA Lysis Tissue) (pH 7,0) с помощью гомогенизатора «SpeedMill Plus» (Analytik Jena, Германия).

Качество полученных препаратов РНК (степень деградированности, отсутствие примесей солей) оценивали электрофоретически в 0,8–1,2% агарозных гелях с использованием стандартных методик.

Количественную оценку содержания матричной РНК (мРНК) в полученных препаратах проводили спектрофотометрически при длине волны 260 нм. Чистоту выделенной тотальной РНК оценивали спектрофотометрически по соотношению величины светопогло-

щения при длине волны 260 нм к таковой при длинах волн:

1) 280 нм ($A_{260/280}$) – соотношение $A_{260/280}$ больше 1,8 свидетельствует об отсутствии примесей полифенолов, полисахаридов и ДНК;

2) 230 нм ($A_{260/230}$) – соотношение $A_{260/230}$ больше 1,8 исключает загрязнение фенолятами, тиоцианатами и другими органическими соединениями. Результаты соответствующих исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1

Конкретные спектрофотометрические характеристики выделенных образцов РНК

Источник РНК ткань/организм	Критерии оценки		
	Выход РНК (мкг/мг ткани)	Чистота полученного препарата РНК, $A_{260/A280}$	Чистота полученного препарата РНК, $A_{260/A230}$
Ткани миокарда/крыса партия 1	3,25±0,045	1,88±0,01	1,94±0,013
Ткани миокарда/крыса партия 2	3,85±0,120	1,92±0,05	1,96±0,024
Ткани миокарда/крыса партия 3	2,80±0,225	1,94±0,06	2,02±0,065
Ткани миокарда/крыса партия 4	3,60±0,125	1,96±0,08	1,98±0,080

Синтез двухцепочечных комплементарных ДНК (кДНК) на матрице тотальной РНК осуществляли методом обратной транскрипции с использованием набора реагентов «ОТ-1» (Синтол, РФ) и обратной транскриптазы «PowerScript» (Clontech Laboratories Inc, США). Оценку количества мРНК исследуемых генов в миокарде проводили методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием системы для ПЦР-амплификации «CFX-96» (Bio-Rad, США).

В качестве гена-нормализатора использовали *BMP4* (bone morphogenetic protein 4 gene), показывающий стабильный уровень экспрессии в сердце при воздействии различных факторов. Для каждого гена с помощью специализированного программного обеспечения («Primer Primer6» и «Primer3») были подобраны специфичные праймеры

(см. табл. 2) и условия реакции для ПЦР-амплификации участков генов (состав ПЦР-смеси, температурные и временные параметры реакции).

Реакция ПЦР-амплификации проводилась в стандартных 96-луночных оптических микропланшетах. В качестве флуорофора использовали краситель EvaGreen (Bio-Rad, США). Выбор указанного красителя был обусловлен его большей чувствительностью по сравнению с аналогом SYBR Green. Конечный состав и объем реакционной смеси и ее компонентов указаны в табл. 3.

Свободную от РНКаз воду, тотальную РНК и Oligo(dT)₁₅-праймер смешивали в пробирке, помещенной в лед. Смесь инкубировали в течение 5 мин при t 70 °С, затем переносили пробирку в лед и добавляли в смесь оставшиеся компоненты. Смесь инкубировали в течение 60 мин при t 37 °С. Реакцию останавливали прогреванием смеси 10 мин при t 70 °С.

Таблица 2

**Последовательности праймеров, подобранных к целевым генам *c-fos* и *c-jun*,
а также к гену-нормализатору – *BMP4***

Целевой ген	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.	T _a , °C	Последовательность праймеров 5'--->3'
<i>c-fos</i>	118	58,5	CGGTCAAGAACATTAGCAACAT
			AGGTCCACATCTGGCACAG
<i>c-jun</i>	154	62,5	GGGGTGCGGAGCCAGCTTCA
			CGGAGGGCTTGGGTGGGAG
<i>BMP4</i>	112	62,5	CGGGAGCAGGTGGACCAGGGG
			GTGTCCAGTAGTCGTGTGATGAGGTG

Примечание. T_a – температура отжига праймеров (annealing temperature). В колонке «Последовательность праймеров» указаны пары (*c-fos* прямой и *c-fos* обратный, *c-jun* прямой и *c-jun* обратный, *BMP4* прямой и *BMP4* обратный) праймеров, необходимых для амплификации участков генов.

Таблица 3

Состав и конечный объем реакционной смеси и ее компонентов

Компоненты реакционной смеси	Объем компонента на одну реакцию, мкл	Конечная концентрация
Свободная от РНКаз вода	15,3	–
Тотальная РНК, 1 мкг/мкл	0,5	500 нг на реакцию
Oligo(dT) ₁₅ -праймер (неспецифичный праймер, комплементарен poly-A хвостам мРНК, помогает отделить мРНК от других фракций РНК, содержащихся в тотальной РНК), 0,5 мкг/мкл	1,0	0,025 мкг/мкл
10x ОТ буфер RT Buffer	2,5	1x
Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTPs), 2,5 mM каждого	4	400 мкМ
Обратная транскриптаза SuperScript, 100 е.а./мкл	1,2	120 е.а. на реакцию
Ингибитор РНКаз, 10 е.а./мкл	0,5	5 е.а. на реакцию
Общий объем, мкл	25	–

Количественную оценку экспрессии генов *c-fos* и *c-jun* проводили с использованием значений пороговых циклов C_t (threshold cycle) – пороговый цикл (номер цикла, на котором график флюоресценции пересекает базовую линию) с помощью пакета программ «CFX Manager Software» (Bio-Rad, США). Для каждой серии экспериментов (ПЦР-реакции) строились калибровочные кривые (графики зависимости C_t от обратного логарифма концентраций мРНК), по которым рассчитывалась эффективность

амплификации как для генов-нормализаторов, так и для исследуемых генов. Разница в показателе эффективности ПЦР (E) составляла не более 5%.

Статистическую обработку изменения уровня экспрессии гена интереса проводили с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ [8], принимая его значение в контроле за 1,0.

Для сравнения различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (достоверность при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Холодовая экспозиция закономерно сопровождалась стимуляцией тиреоидной функции,

в результате чего уровень ЙТГ в крови животных повышался (табл. 4): T₃ – на 17%, T₄ – на

16%, $T_{3\text{св}}$ – на 20%, $T_{4\text{св}}$ – на 32%. В ответ на это сывороточное содержание ТТГ падало на 60%. Повышение концентрации ЙТГ коррелировало с увеличением экспрессии генов ран-

него ответа в миокарде: в наибольшей степени возрастал уровень мРНК *c-jun* – на 45% ($p < 0,05$) (рис. 1), менее значительно *c-fos* – на 32% ($p < 0,05$) (рис. 2).

Таблица 4

Изменение концентрации ЙТГ и ТТГ в крови при стрессе у животных с интактным и измененным тиреоидным статусом

Группа животных	Концентрация общего трийодтиронина, нмоль/л	Концентрация общего тироксина, нмоль/л	Концентрация свободных фракций трийодтиронина, пмоль/л	Концентрация свободных фракций тироксина, пмоль/л	Концентрация тиреотропного гормона, мМЕ/л
1. Контроль	1,612 (1,559; 1,633)	54,906 (54,341; 56,594)	4,066 (3,717; 4,083)	15,241 (14,810; 16,159)	0,085 (0,067; 0,100)
2. Холод p 1–2	1,882 (1,868; 1,897) $p < 0,01$	63,638 (62,897; 64,317) $p < 0,01$	4,873 (4,586; 5,417) $p < 0,01$	20,100 (18,500; 21,796) $p < 0,01$	0,034 (0,026; 0,040) $p < 0,01$
3. Алкоголь p 1–3 p 2–3	1,385 (1,368; 1,391) $p < 0,01$ $p < 0,01$	49,340 (48,821; 49,545) $p < 0,01$ $p < 0,01$	3,323 (3,309; 3,374) $p < 0,01$ $p < 0,01$	12,175 (12,069; 12,461) $p < 0,01$ $p < 0,01$	0,171 (0,160; 0,173) $p < 0,01$ $p < 0,01$
4. Свободное плавание в клетке p 1–4 p 2–4 p 3–4	1,138 (1,133; 1,143) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	41,259 (41,067; 41,550) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	2,834 (2,346; 3,245) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	11,099 (11,071; 11,418) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,05$	0,181 (0,172; 0,185) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p > 0,05$
5. Мерказолил p 1–5	1,118 (1,113; 1,131) $p < 0,01$	40,929 (39,373; 41,889) $p < 0,01$	2,732 (2,623; 2,922) $p < 0,01$	10,608 (10,349; 10,761) $p < 0,01$	0,184 (0,176; 0,196) $p < 0,01$
6. Мерказолил и холод p 5–6 p 1–6 p 2–6	1,078 (1,058; 1,089) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	39,104 (39,002; 40,290) $p > 0,05$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	2,480 (2,447; 2,520) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	10,533 (10,422; 10,575) $p > 0,05$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	0,048 (0,034; 0,091) $p < 0,01$ $p > 0,05$ $p > 0,05$
7. Мерказолил и алкоголь p 5–7 p 1–7 p 3–7	1,010 (0,993; 1,037) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	36,629 (36,523; 37,710) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	2,390 (2,358; 2,401) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	10,054 (9,819; 10,096) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	0,067 (0,017; 0,111) $p < 0,01$ $p > 0,05$ $p < 0,01$
8. Мерказолил и свободное плавание в клетке p 5–8 p 1–8 p 4–8	0,912 (0,846; 0,983) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	35,691 (35,236; 36,081) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	2,272 (2,245; 2,304) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	9,502 (9,431; 9,858) $p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$	0,110 (0,080; 0,132) $p < 0,05$ $p > 0,05$ $p < 0,05$
9. Тироксин p 1–9	1,538 (1,502; 1,606) $p > 0,05$	55,433 (54,452; 57,171) $p > 0,05$	3,839 (3,747; 3,872) $p > 0,05$	15,377 (14,836; 15,695) $p > 0,05$	0,075 (0,073; 0,097) $p > 0,05$

Продолжение табл. 4

Группа животных	Концентрация общего трийодтиронина, нмоль/л	Концентрация общего тироксина, нмоль/л	Концентрация свободных фракций трийодтиронина, пмоль/л	Концентрация свободных фракций тироксина, пмоль/л	Концентрация тиреотропного гормона, мМЕ/л
10. Тироксин и холод	1,751 (1,716; 1,799)	58,003 (55,946; 61,632)	4,265 (4,218; 4,332)	16,535 (14,088; 18,140)	0,051 (0,048; 0,054)
<i>p</i> 9–10	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> < 0,01
<i>p</i> 1–10	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> < 0,01
<i>p</i> 2–10	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,05	<i>p</i> < 0,01
11. Тироксин и алкоголь	1,487 (1,464; 1,570)	54,518 (52,970; 59,622)	3,594 (3,581; 3,691)	13,814 (13,549; 14,815)	0,111 (0,080; 0,113)
<i>p</i> 9–11	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05
<i>p</i> 1–11	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> > 0,05
<i>p</i> 3–11	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,05	<i>p</i> < 0,05	<i>p</i> < 0,01
12. Тироксин и свободное плавание в клетке	1,401 (1,389; 1,419)	50,751 (50,553; 50,974)	3,475 (3,436; 3,514)	13,206 (13,087; 13,377)	0,121 (0,110; 0,139)
<i>p</i> 9–12	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01
<i>p</i> 1–12	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01
<i>p</i> 4–12	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01

Примечание. *p* – достоверность различий между группами.

Введение алкоголя, напротив, приводило к угнетению тиреоидпродуцирующей функции щитовидной железы: уровень T_3 в крови уменьшался на 14%, T_4 – на 10%, T_3 св – на 18%, T_4 св – на 20%. В ответ на падение концентрации ЙТГ в крови развивалось регуляторно-обусловленное увеличение содержания ТТГ – на 101%. При этом уровень мРНК исследованных генов возрастал менее значительно, чем после холодового стресса: *c-fos* – на 44% (*p* < 0,05), *c-jun* – на 36% (*p* < 0,05), т.е. в отличие от последнего в наибольшей мере увеличивался уровень мРНК *c-fos*. СПК вызывал еще большее снижение сывроточного содержания ЙТГ: концентрация T_3 уменьшалась на 29%, T_4 – на 25%, T_3 св – на 30%, T_4 св – на 27%, что приводило к более существенному, чем после введения алкоголя, повышению содержания ТТГ в крови – на 113%. Возрастание уровней мРНК *c-fos* и *c-jun* также было наибольшим: на 59% (*p* < 0,05) и 52% (*p* < 0,05). Следовательно, физический стресс, характеризующийся активацией тиреоидной функции, а также химический и особенно эмоциональный, приводящие к снижению концентрации ЙТГ в крови, вызывают стимуляцию экспрессии генов раннего ответа в миокарде. При этом

после физического стресса в наибольшей мере повышается экспрессия *c-jun*, а после химического и эмоционального – *c-fos*.

Введение мерказолила привело к падению сывроточного содержания ЙТГ на 25–33% и компенсаторному возрастанию концентрации ТТГ в крови на 116%. Вместе с тем, экспериментальный гипотиреоз сам по себе незначительно стимулировал экспрессию исследованных генов в миокарде: в несколько большей мере *c-fos* – уровень его мРНК возрастал на 14% (*p* < 0,05), тогда как *c-jun* – на 11% (*p* < 0,05).

В отличие от холодовой экспозиции у эутиреоидных крыс, это воздействие у гипотиреоидных животных не вызвало повышения содержания ЙТГ в крови. Более того, сывроточная концентрация T_3 и T_3 св незначительно уменьшалась. В ответ на это уровень ТТГ в крови не увеличивался, как у эутиреоидных крыс, перенесших воздействие холода, а падал. Экспрессия изученных генов в сердце, в отличие от животных, не получавших мерказолил и подвергнутых холодовой экспозиции, не возрастала (*p* > 0,05 по отношению к группе «Мерказолил»). Введение алкоголя вызывало снижение сывроточной концентрации ЙТГ,

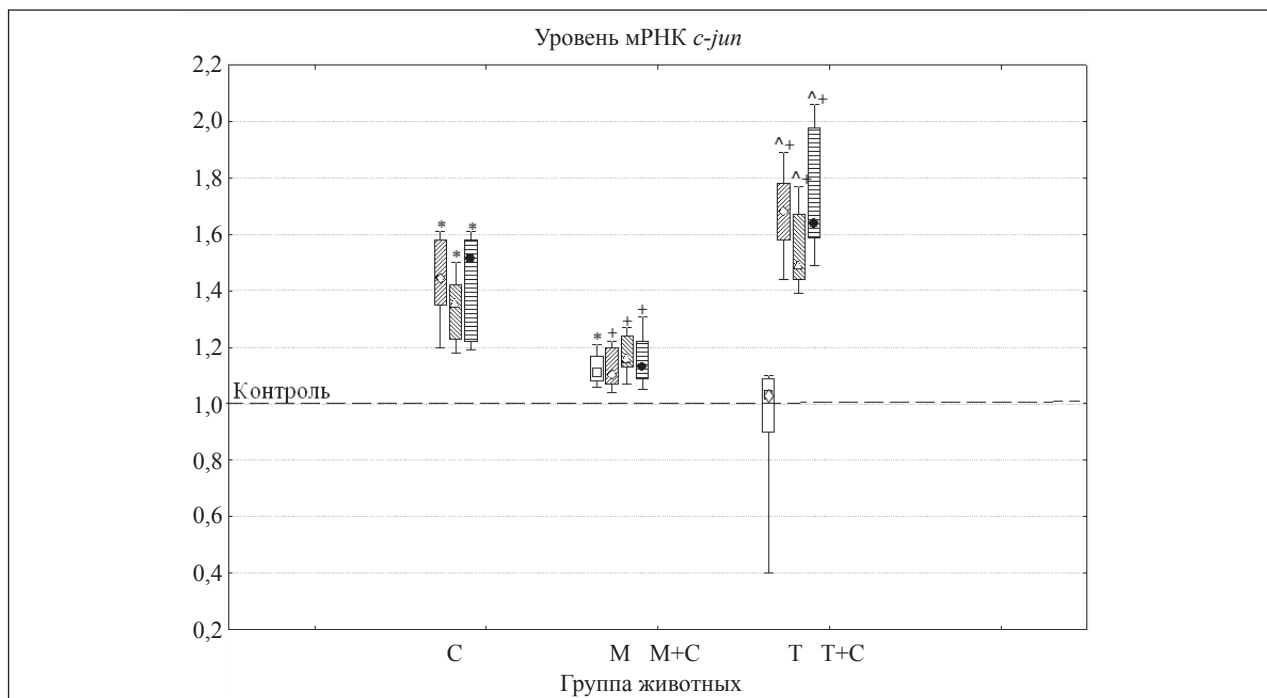


Рис. 1. Уровень мРНК *c-jun* в миокарде при стрессе у животных с различным тиреоидным статусом

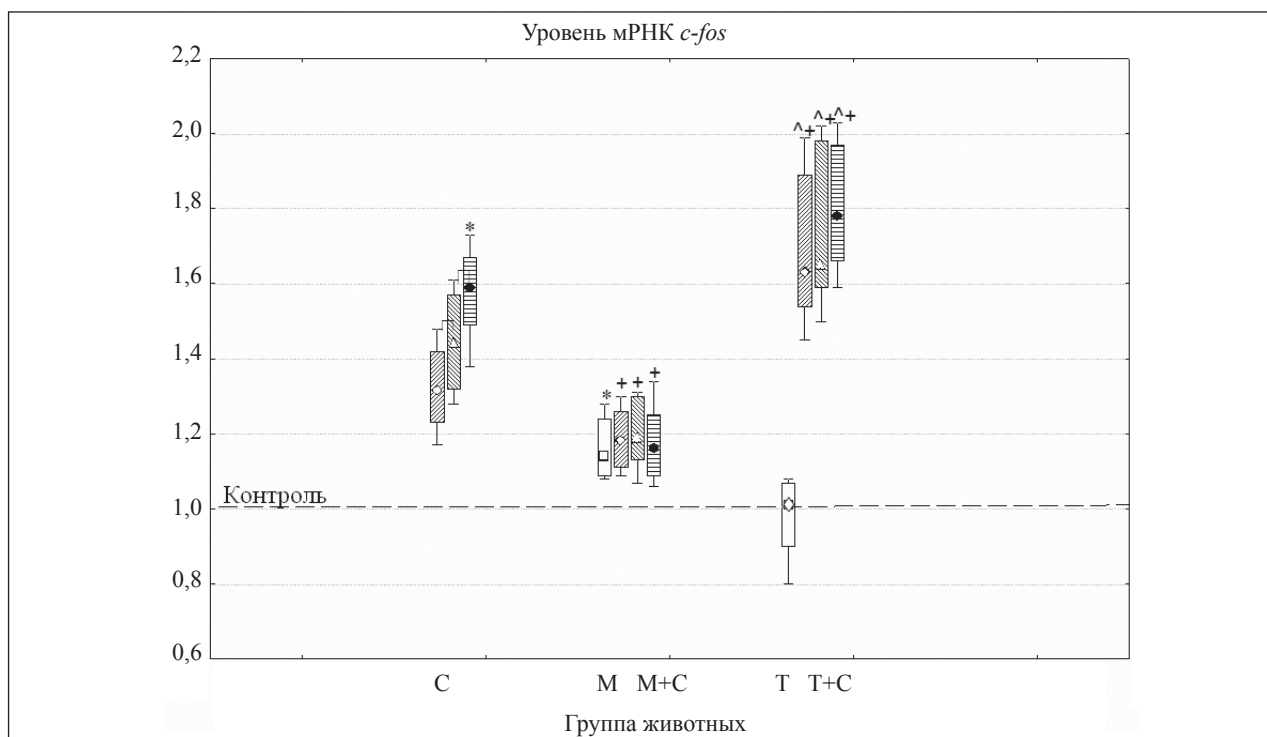


Рис. 2. Уровень мРНК *c-fos* в миокарде при стрессе у животных с различным тиреоидным статусом

Примечания. Здесь и на рис. 2: 1) $\circ \Delta \bullet \square \diamond$ – медианы;

2) $\square$ – (LQ; UQ) – верхняя граница нижнего квартиля и нижняя граница верхнего квартиля;

3) I – минимальное и максимальное значения показателя;

4) стрессоры: $\boxminus$ – холод, $\boxplus$ – алкоголь; $\boxtimes$ – СПК;

5) $p < 0,05$ по отношению: * – к контролю; # – к соответствующему стрессу; + – к контролю и соответствующему стрессу; ^ – к группе животных, получавших тироксин;

6) группы животных (в каждой по 6 особей): C – стресс; M – мерказолил; M+C – мерказолил и стресс; T – L-тироксин; T+C – L-тироксин+стресс.

как и при таком же воздействии у эутиреоидных крыс: по сравнению с группой «Мерказолил» на 4–8%. Однако содержание ТТГ в крови не возрастало, а падало. Уровни мРНК *c-fos* и *c-jun* не повышались, как у эутиреоидных животных, подвергнутых воздействию химического стресса ($p > 0,05$ по сравнению с группой «Мерказолил»). СПК, как и введение алкоголя, приводил к снижению концентрации и ЙТГ (на 8–12%), и ТТГ в крови. Экспрессия исследованных генов в противоположность животным, перенесшим СПК без мерказолила, не возрастала ($p > 0,05$ по отношению к группе «Мерказолил»).

По сравнению с контролем после холодовой экспозиции у гипотиреоидных животных сывороточное содержание ЙТГ было меньшим на 29–39%, ТТГ таким же. Уровни мРНК изученных генов были выше контроля, однако в меньшей степени, чем при аналогичном стрессе у эутиреоидных крыс: *c-fos* на 18% ($p < 0,05$), *c-jun* на 10% ($p < 0,05$). После химического стресса концентрация ЙТГ в крови была меньшей на 33–41%, ТТГ такой же, как в контроле. Экспрессия *c-fos* и *c-jun* превышала его всего на 19% ($p < 0,05$) и 16% ($p < 0,05$), т.е. менее значительно, чем при химическом стрессе у эутиреоидных животных. После СПК у крыс, получавших мерказолил, сывороточное содержание ЙТГ было меньшим, чем в контроле, на 35–44%, ТТГ не отличалось от него. Уровни мРНК *c-fos* и *c-jun* были выше контроля лишь на 16% ($p < 0,05$) и 13% ($p < 0,05$), т.е. менее существенно, чем у подвергнутых СПК эутиреоидных крыс.

По сравнению со стрессированными эутиреоидными животными после холодовой экспозиции, у крыс, получавших тиреостатик, сывороточная концентрация ЙТГ была ниже на 45–63%, а ТТГ такой же. Низкое содержание ЙТГ в крови коррелировало с меньшими уровнями мРНК исследованных генов: *c-fos* – на 14% ($p < 0,05$), *c-jun* – на 35% ($p < 0,01$). После введения алкоголя концентрация ЙТГ была меньшей на 14–23%, как и ТТГ – на 122%. Этому соответствовали значительно меньшие уровни мРНК *c-fos* и *c-jun* – на 25% ($p < 0,01$) и 20% ($p < 0,05$). После СПК уровень ЙТГ в крови был ниже на 10–14%, ТТГ – на 84%. Низкое содержание ЙТГ сочеталось с существенно меньшим уровнем мРНК изученных генов:

c-fos – на 43% ($p < 0,01$), *c-jun* – на 39% ($p < 0,05$).

Следовательно, экспериментальный гипотиреоз *per se* приводит к снижению концентрации ЙТГ, возрастанию сывороточного содержания ТТГ и незначительно стимулирует экспрессию генов раннего ответа в миокарде. В условиях физического стресса он предупреждает возрастание уровня ЙТГ в крови, а после воздействия химического и эмоционального способствует более значительному падению их концентрации, устраняя регуляторно-обусловленные изменения содержания ТТГ. Вместе с тем, экспериментальный гипотиреоз предотвращает возрастание уровней мРНК *c-fos* и *c-jun* при всех изученных стрессах.

Введение L-тироксина в малых дозах само по себе не повлияло как на сывороточную концентрацию ЙТГ и ТТГ, так и на уровень мРНК генов раннего ответа в миокарде ($p > 0,05$).

Воздействие холода на крыс, получавших L-тироксин, в отличие от такого же стресса у не получавших данный препарат животных, приводило к увеличению содержания в крови только T_3 и T_3 св: по отношению к группе «Тироксин» на 14 и 11%. Сывороточная концентрация ТТГ уменьшалась на 28%. Экспрессия исследованных генов, как и у стрессированных без L-тироксина животных, возрастала, однако более существенно: уровень мРНК *c-fos* увеличивался на 62% ($p < 0,01$), *c-jun* – на 65% ($p < 0,01$). Введение алкоголя животным, получавшим L-тироксин, не вызывало изменения содержания ТТГ и ЙТГ в крови. Экспрессия генов раннего ответа повышалась в большей степени, чем у животных, перенесших такое же воздействие без L-тироксина: по сравнению с группой «Тироксин», уровень мРНК *c-fos* возрастал на 64% ($p < 0,01$), *c-jun* – на 46% ($p < 0,01$). СПК у крыс, получавших L-тироксин, хотя и сопровождался снижением сывороточной концентрации ЙТГ, наблюдавшимся при таком же воздействии у животных, не получавших L-тироксин, однако менее выраженным: по сравнению с группой «Тироксин» содержание ЙТГ в крови снижалось на 8–14%. В ответ на это сывороточный уровень ТТГ повышался на 54%. Вместе с тем, экспрессия исследованных генов после СПК была существенно выше, чем у стрессированных без препарата крыс: *c-jun* – на 61% ($p < 0,01$), *c-fos* – на 77% ($p < 0,01$).

По отношению к контролю после экспозиции холодом у животных, получавших малые дозы L-тироксина, содержание T_3 в крови было больше на 9%, T_3 св – на 5%, T_4 и T_4 св – таким же, ТТГ меньше на 40%. Уровни мРНК *c-fos* и *c-jun* превышали контроль более значительно, чем при холодовом воздействии у крыс, не получавших L-тироксин – на 63% ($p < 0,05$) и 68% ($p < 0,05$). Из показателей, характеризующих тиреоидную функцию, после введения алкоголя от контроля отличалась лишь сывороточная концентрация свободных ЙТГ: $T_{3\text{св}}$ была ниже на 12%, $T_{4\text{св}}$ – на 9%. Стимуляция экспрессии обоих изученных генов была более выражена, чем у животных, перенесших аналогичный стресс без L-тироксина: уровень мРНК *c-fos* был выше на 65% ($p < 0,05$), *c-jun* – на 49% ($p < 0,05$). После СПК уровень всех ЙТГ в крови был меньшим на 8–15%, сывороточное же содержание ТТГ, напротив, было большим – на 42%. Уровни мРНК *c-fos* и *c-jun* превышали контроль на 78% ($p < 0,05$) и 64% ($p < 0,05$), т.е. более существенно по сравнению со стрессированными без L-тироксина крысами.

По сравнению с животными, перенесшими холодовой стресс без L-тироксина, после воздействия холодом у получавших его крыс концентрация ЙТГ в крови была меньшей на 8–24%, ТТГ большей на 20%. Экспрессия *c-fos* была выше на 31% ($p < 0,01$), *c-jun* – на 23% ($p < 0,05$). После введения алкоголя у животных, получавших L-тироксин, по сравнению со стрессированными без него крысами, со-

держание ЙТГ было больше на 6–11%, ТТГ меньшим на 70%. Повышенная сывороточная концентрация ЙТГ коррелировала с более высокими уровнями мРНК обоих генов: *c-fos* на 21% ($p < 0,05$), *c-jun* на 13% ($p < 0,05$). По сравнению с аналогичными показателями функции щитовидной железы при СПК у животных, не получавших L-тироксин, у крыс, перенесших стресс после его введения, содержание ЙТГ в крови было больше на 14–17%, а ТТГ меньше на 71%. Увеличенный уровень ЙТГ коррелировал с более выраженной экспрессией исследованных генов: *c-fos* – на 19% ($p < 0,05$), *c-jun* на 12% ($p < 0,05$).

Следовательно, введение малых доз L-тироксина само по себе не влияет на тиреоидный статус и уровни мРНК генов раннего ответа. При холодовом стрессе L-тироксин ограничивает возрастание сывороточной концентрации ЙТГ и обеспечивает большую по сравнению со стрессированными без L-тироксина крысами стимуляцию экспрессии *c-fos* и *c-jun*. При химическом стрессе L-тироксин обеспечивает сохранение тиреоидного статуса и большую индукцию экспрессии изученных генов, чем после аналогичного воздействия у животных, не получавших его. При эмоциональном стрессе введение L-тироксина лимитирует изменение тиреоидпродуцирующей функции щитовидной железы и обеспечивает более высокие уровни мРНК *c-fos* и *c-jun* в миокарде по сравнению с животными, перенесшими такой же стресс без него.

Заключение

Таким образом, все примененные нами стрессоры (физический, химический, эмоциональный) вызывают изменение тиреоидной функции, направленность и выраженность которой зависят от природы стрессового фактора: физический стрессор ее стимулирует, тогда как химический и, особенно, эмоциональный – угнетают, что проявляется соответствующим изменением содержания ЙТГ в крови, преимущественно, их свободных фракций. В ответ на сдвиги сывороточного уровня ЙТГ происходит адекватное изменение концентрации ТТГ в крови: снижение при холодовом, возрастание при химическом и эмоциональном стрессе, что свидетельствует о сохранении нормальных регуляторных взаимоотношений в гипотизарно-

тиреоидной системе. Вместе с тем, все примененные нами факторы вызывают повышение экспрессии генов раннего ответа в сердце, степень которого также зависит от природы стрессора: наибольшая после эмоционального стресса, наименьшая после холодового воздействия (*c-fos*) и химического (*c-jun*). В условиях одного и того же стресса экспрессия изученных генов увеличивается также неодинаково. После холодового стресса в наибольшей степени возрастает экспрессия *c-jun*, тогда как после химического и эмоционального – *c-fos*.

Экспериментальный гипотиреоз *per se* приводит к падению сывороточного уровня ЙТГ и компенсаторному увеличению концентрации ТТГ в крови, а также незначительно стимули-

рует экспрессию генов раннего ответа. При воздействии физического фактора он устраняет возрастание сывороточного содержания ЙТГ, при химическом и эмоциональном стрессе способствует его более существенному падению. Отсутствие повышения концентрации ТТГ в крови у стрессированных гипотиреоидных крыс в ответ на падение уровня ЙТГ в крови указывает на возникновение дисбаланса регуляции в системе гипофиз-щитовидная железа. Вместе с тем, экспериментальный гипотиреоз предотвращает возрастание уровней мРНК *c-fos* и *c-jun* в миокарде в условиях всех примененных воздействий. Это свидетельствует о «выключении» им стимуляции экспрессии генов раннего ответа при стрессе.

Введение малых доз L-тироксина, само по себе не изменяющее тиреоидную функцию, способствует меньшей ее мобилизации в условиях холодового стресса, определяет сохранение тиреоидного гомеостаза в условиях химического, минимизирует его изменение в условиях эмоционального. В условиях всех стрессов сдвиг содержания ТТГ имеет компенсаторный характер, что свидетельствует о нормальном функционировании «короткой» петли обратной связи в гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системе. Малые дозы L-тироксина не влияют на экспрессию генов раннего ответа в миокарде *per se*, однако при воздействии всех примененных нами стрессоров обеспечивают ее большую стимуляцию.

Среди возможных механизмов участия ЙТГ в регуляции экспрессии генов раннего ответа, прежде всего, необходимо отметить их геномное действие, реализующееся, во первых, классическим путем – в результате связывания T_3 с рецепторами тиреоидных гормонов (TR α 1 и TR β 1) в специфических элементах ответа (Thyroid hormone Response Elements (TREs)), расположенных в промоторных областях генов-мишеней; во-вторых, недавно открытым неклассическим путем [9] за счет:

- активации фосфатидилинозитол-3-киназы (phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)) после связывания T_3 [10] либо с TR β , либо с S1 типом мембранного рецептора ЙТГ – интегрином α -v β -3 (integrin α v β 3/S1) [11];
- активации одного из MAPK-сигнальных путей (mitogen-activated protein kinase), в частности, ERK1/2 (extracellular signaling

related kinase), после связывания T_4 [12] и, в меньшей степени, T_3 [13] с S2 типом указанного рецептора – α v β 3/S2.

PI3K активирует сигнальный путь Akt/PKB путем фосфорилирования протеинкиназы B (PKB), которая, в свою очередь, индуцирует ключевое звено регуляторных путей клеточного роста – mTOR (mammalian target of rapamycin) и, в конечном итоге, серин/треониновую киназу p70S6, фосфорилирующую рибосомальный белок S6, что приводит к стимуляции синтеза белка в рибосомах.

Такое же влияние оказывает ERK1/2, фосфорилирующая киназу p90S6. Кроме того, диффундируя в ядро, ERK1/2 индуцирует экспрессию генов раннего ответа, продукты которых обеспечивают транскрипцию поздних генов, ответственных за пролиферацию и выживание клеток [14].

Т.е. начальный этап неклассического действия ЙТГ – негеномный, однако в последующем он приводит к стимуляции транскрипции генов, независимых от TREs.

Кроме того, негеномное действие ЙТГ может быть опосредовано через повышение ими внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [15] и циклического АМФ [16].

Необходимо учитывать и влияние ЙТГ на осуществление ответа клетки на действие катехоламинов [17] и процессы перекисного окисления липидов в миокарде [18] с учетом доказанного значения этих факторов в регуляции экспрессии генов раннего ответа.

С реализацией вышеописанных механизмов связана обнаруженная нами стимуляция экспрессии генов *c-fos* и *c-jun* в миокарде при стрессе.

Незначительное повышение уровней мРНК *c-fos* и *c-jun* при гипотиреозе, также наблюдавшееся в наших исследованиях, обусловлено тем, что ингибирование синтеза белка увеличивает экспрессию генов раннего ответа по механизму обратной связи [19]. Отсутствие стимуляции их экспрессии при стрессе у гипотиреоидных животных связано с «выпадением» вышеуказанных эффектов ЙТГ.

В целом, полученные результаты помогают выявить новый аспект участия ЙТГ в формировании защитной реакции организма при стрессе – их стимулирующее влияние на экспрессию генов раннего ответа.

Список использованных источников

1. Kerr, L.D. The early response genes *c-fos* and *c-jun* are members of a multigene family implicated in a number of stress-induced signal transduction cascades and thus provide useful models for investigating stress-invoked alterations in gene expression / L.D. Kerr, J. Inoue, I.M. Verma // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1992. – № 123. – P. 496–501.
2. Martinez, M.B. Altered response to thyroid hormones by prostate and breast cancer cells / M.B. Martinez, M. Ruan, L.A. Fitzpatrick // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2000. – Vol. 45, № 2. – P. 93–102.
3. Городецкая, И.В. Влияние йодсодержащих тиреоидных гормонов на перекисное окисление липидов и антиоксидантную систему миокарда при кратковременных стрессах в эксперименте / И.В. Городецкая, О.В. Евдокимова // *Известия НАН Беларуси. Серия мед. наук.* – 2013. – № 3. – С. 46–52.
4. Значение тиреоидных гормонов в стрессиндуцированном синтезе белков теплового шока в миокарде / И.В. Городецкая [и др.] // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* – 2000. – Т. 117, № 12. – С. 617–619.
5. Божко, А.П. Повреждение миокарда при иммобилизационном стрессе и защитный эффект тиреоидных гормонов / А.П. Божко, Т.А. Сухорукова, Л.И. Арчакова // *Архив анат. гистол. и эмбриол.* – 1987. – № 6. – С. 25–27.
6. Божко, А.П. К механизму антистрессорного кардиального эффекта тиреоидных гормонов // А.П. Божко, А.П. Солодков, Т.А. Сухорукова // *Физиол. и биох. аспекты патол. процессов* – 1990. – С. 100–104.
7. Манухина, Е.Б. Влияние различных методик стрессирования и адаптации на поведенческие и соматические показатели у крыс / Е.Б. Манухина, Н.А. Бондаренко, О.Н. Бондаренко // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* – 1999. – Т. 129, № 8. – С. 157–160.
8. Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Nature Protocols.* – 2008. – Vol. 3, № 6. – P. 1101–1105.
9. Moeller, L.C. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone / L.C. Moeller, M. Broecker-Preuss // *Thyr. Res.* – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 1–6.
10. Hypoxia-inducible factor in thyroid carcinoma / N. Burrows [et al.] // *Thyr. Res.* – 2011. – Vol. 20, № 11. – P. 1–17.
11. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase / H.Y. Lin [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2009. – Vol. 296, № 5. – P. 980–991.
12. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor / H.Y. Tang [et al.] // *Intracel. sig.* – 2004. – Vol. 145, № 7. – P. 3265–3275.
13. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic / H.Y. Lin [et al.] // *Steroids.* – 2007. – Vol. 72, № 2. – P. 180–187.
14. Mebratu, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? / Y. Mebratu, Y. Tesfaigzi // *Cell Cycle.* – Vol. 15, № 8. – P. 1168–1175.
15. Intracellular and plasma membrane-initiated pathways involved in the $[Ca^{2+}]_i$ elevations induced by iodothyronines (T_3 and T_2) in pituitary GH3 cells / A. Del Viscovo [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2012. – Vol. 302, № 11. – P. 1419–1430.
16. Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta / M. Yamauchi [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2008. – Vol. 22, № 4. – P. 893–903.
17. Effects of thyroid hormone on catecholamine and its metabolite concentrations in rat cardiac muscle and cerebral cortex / T. Mano [et al.] // *Thyroid.* – 1998. – Vol. 8, № 4. – P. 353–358.
18. Городецкая, И.В. Влияние йодсодержащих тиреоидных гормонов на перекисное окисление липидов и антиоксидантную систему миокарда при кратковременных стрессах в эксперименте / И.В. Городецкая, О.В. Евдокимова // *Известия НАН Беларуси. Серия мед. наук.* – 2013. – № 3. – С. 46–52.
19. Akins, P.T. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? / P.T. Akins [et al.] // *Stroke.* – 1996. – Vol. 27, № 9. – P. 1682–1687.

Дата поступления статьи 10 марта 2014 г.

В.В. Слиzenь, Ж.Ф. Циркунова, Е.И. Гудкова, О.Ч. Глаз

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *SALMONELLA ENTERICA* СЕРОВАР *TYPHIMURIUM* МЕТОДОМ ПЦР

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

Введение

Сальмонеллез – острая инфекционная болезнь, вызываемая микробами рода *Salmonella*, протекающая преимущественно как острая кишечная инфекция по типу гастроэнтерита, реже – в виде генерализованных (септических) форм. По данным ВОЗ, заболеваемость нетифоидным сальмонеллезом во всём мире превышает 1 млрд. случаев в год, а смертность от него составляет 3 млн. случаев в год [1]. Массовое обследование пациентов в 6 регионах Финляндии, Австралии, Дании и Канады (2000–2007 гг.) показало 622 случая сальмонеллезной бактериемии, а средний ежегодный показатель в указанный период составил 1,02 на 100 000 человек [2]. Ежегодно у населения США регистрируется около 1,4 млн. случаев заболевания сальмонеллезом, что составляет 26% от всех случаев пищевых токсикоинфекций в этой стране, причем чаще заболевают люди в возрасте 65 лет и старше [3]. В Республике Беларусь сальмонеллезы имеют самые высокие показатели заболеваемости среди бактериальных кишечных инфекций (45,38 на 100 000 в 2009 г.) [4].

На сегодняшний день выявлено более 2500 разных штаммов *Salmonella* (называемых «серотипами», или «сероварами»). Большинство сальмонелл вида *enterica* патогенны как для человека, так и для животных и птиц, но в эпидемиологическом отношении наиболее значимы для человека лишь некоторые из них. 90% случаев сальмонеллезом приходится на *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Panama*, *S. Infantis*, *S. Newport*, *S. Agona*, *S. Derby* и *S. London* [5, 6]. Более 50% случаев всех заболеваний, связанных с заражением сальмонеллой в США, приходится на серотипы *S. Typhimurium* и *S. Enteritidis*.

В 80-х гг. XX в. в Англии впервые был выделен новый полиантибиотикорезистентный клон *S. Typhimurium* DT104, вызывающий внутрибольничные заболевания сальмонеллезом [7].

В США частота выделения подобных изолятов уже превышает 35% [8]. В литературе представлены данные, свидетельствующие о широком распространении на территории России, Беларуси и Казахстана полирезистентных штаммов *S. Typhimurium*, которые служат причиной всплеск внутрибольничного сальмонеллеза [9]. Исследования, проведенные в г. Минске в 1990–2009 гг. показали, что удельный вес случаев заболевания, вызванных *S. Typhimurium* колебался от 0,9% в 1991 г. до 15,3% в 1993 г., в группе риска заболевания сальмонеллезом, вызванными данным серовариантом, оказались дети 0–12-месячного возраста [4].

В 1997 г. США начала проводить программу PR/HACCP (Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point), предусматривающую регулярное исследование на сальмонеллез различных мясных продуктов. В результате ее осуществления заболеваемость населения в большинстве регионов страны начала снижаться [3]. Существуют программы по снижению сальмонеллезом, которые направлены на избирательный контроль распространения тех серовариантов, которые наиболее часто вызывают заболевания у людей.

Сальмонеллы имеют определенную антигенную структуру, благодаря которой и осуществляется их идентификация. У них определяются 3 вида антигенов – О-(соматический антиген), Н-(жгутиковый антиген) и Vi-(капсулярный). Их распознавание положено в основу диагностической антигенной схемы Кауфманна-Уайта. Дополнительным способом идентификации сальмонелл в последние годы служат генетические методы, которые являются более точными, позволяют быстрее получить результат.

Цель настоящей работы – изучение возможности идентификации сероварианта *S. Typhimurium* методом ПЦР.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали 49 культур сальмонелл (*Enteritidis* – 10 штаммов, *Typhimurium* – 21, *London* – 2, *Derby* – 2, *Branderburg* – 2, *Agama* – 1, *Choleraesiris* – 2, *Virchow* – 2, *Haifa* – 1, *Infantis* – 3, *Maenster* – 1, *Reading* – 1, *Weltevreden* – 1), изолированных от пациентов, проходивших лечение в детской и взрослых городских инфекционных больницах г. Минска.

Сальмонеллы культивировали на среде Эндо и Левина при температуре 37 °С в течение 18–24 ч.

Экстракцию бактериальной ДНК проводили путем инкубации 16–20-часовой чистой культуры сальмонелл при 98 °С в течение 10 мин в 5%-ной суспензии Chelex-100 в 1х ТАЕ буфере, с последующим центрифугированием 13 000 g в течение 10 мин. Исследовали супернатант.

Для амплификации гена *fliC* использовали праймеры: 250-FliC-I-F-5-GCAGAT

CAACTCTCAGACCCTGGG-3 и 250-FliC-I-R-5-ATAGCCATCTTTACCAGT TCC-3 [10]; гена *mdh* – DH-F-TGCCAACGGAAGTTGAAGTG и MDH-R- CGCATTC-ACCACGCCCTTC [11]. Выявление сальмонелл, относящихся к фаготипу DT104, проводили с использованием праймеров DT104-F-GTCAGCAGTG-TATGGAGGA и DT104-R-AGTAGCGCCAG-GACTCGTTA [12].

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала из расчета на одну реакцию: 1х ПЦР буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 – 1,5 мМ, каждого дНТФ – по 2 мМ, Taq-полимераза – 1,25 ед., праймер – 20 пкМ, образец ДНК – 10 мкл.

Наличие продуктов амплификации выявляли электрофоретически: в 1,5%-ный агарозный гель, содержащий бромид этидия (0,5 мкг/мл) вносили по 16 мкл образцов; параметры электрофореза – 200 В, 100 мА, 1 ч.

Результаты и обсуждение

Исследования по изучению возможности использования метода ПЦР для определения серовариантов *Salmonella spp.* активно ведутся во многих странах мира. Интерес к подобным исследованиям вызван, прежде всего, тем, что традиционно используемый метод серотипирования трудоемок, длителен по времени, требует высококвалифицированного персонала и большого количества дорогостоящих сыровороток.

Клональную вариабельность внутри вида *S. enterica* определяют главным образом, флагеллярные (H) и полисахаридные антигены (O). Большинство штаммов сальмонелл (двухфазные штаммы) могут производить два разных флагелина (H_1 и H_2), причем в любой момент времени бактерия экспрессирует только один тип флагеллина. Соответственно, в геноме сальмонеллы присутствуют два разных гена флагеллина (*fliC* и *fliB*) [13]. Показано, что большинство известных H-серотипов детерминируются различиями в гене *fliC* [14]. Данный ген может иметь аллели H:i, H:r, H:l,v, H:e,h, H:b, H:z10 и др., по которым можно идентифицировать сероварианты сальмонелл. Были секвенированы различные внутренние регионы гена *fliC*, кодирующие фазы H:i, H:r, H:l,v, H:e,h, H:z10, H:b, и H:d, а также идентифици-

рована первичная структура генетических локусов, ответственных за формирование первой фазы различных серовариантов сальмонелл.

Для идентификации *S. Typhimurium* проводили амплификацию специфического фрагмента гена *fliC* с помощью праймеров [10], температура отжига составляла 58 °С – 45 с. В работе был протестирован 21 штамм *S. Typhimurium*, у 20 из них в процессе амплификации гена *fliC* образовывались продукты размером 250 п.о. У сальмонелл других серовариантов (28 изолятов), таких как *Enteritidis*, *Virchow*, *Agama*, *Derby*, *Brandenburg*, *London* и *Infantis* реакция была отрицательной. На рис. 1 представлены результаты амплификации гена *fliC* у 9 штаммов *S. Typhimurium*, в качестве отрицательных контролей показаны штаммы *S. Enteritidis*, *S. London* и *S. Infantis*.

Для *S. Typhimurium* характерно наличие фермента малатдегидрогеназы, ключевого фермента цикла трикарбоновых кислот, катализирующего окислительно-восстановительную реакцию превращения малата в оксалоацетат. Следовательно, в качестве маркера данного сероварианта могут выступать локусы гена, кодирующего малатдегидрогеназу. Идентификация *S. Typhimurium* амплификацией гена *mdh* описана в литературе [11]. Тайваньскими

фрагменты размером 261 п.о. Другие исследованные бактерии, принадлежащие к роду *Enterobacteriaceae*, в том числе и сальмонеллы других серовариантов, ложноположительных результатов не давали [11].



Дорожки 1–5, 8, 9, 12, 13 – *S. Tythimurium*; 6 – *S. London*; 7 – *S. Infantis*, 10, 11 – *S. Enteritidis*; М – маркер молекулярной массы Gene Ruler™ 50 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва)

Для выявления *S. Typhimurium* и среди них мультирезистентных штаммов, относящихся к фаготипу DT104, нами также была поставлена

дуплексная ПЦР с праймерами к генам *mdh* и *DT104* [17, 18], температура отжига составила 63 °С – 1 мин. В случае выявления изолятов *S. Typhimurium* образовывался один ампликон размером 261 п.о., а штаммов относящихся к

фаготипу DT104 – 2 (261 и 162 п.о.). Результаты дуплексной ПЦР представлены на рис. 3. Установлено, что результаты отдельных ПЦР на выявление генов *mdh* и *DT104* полностью совпадают с результатами дуплексной ПЦР.

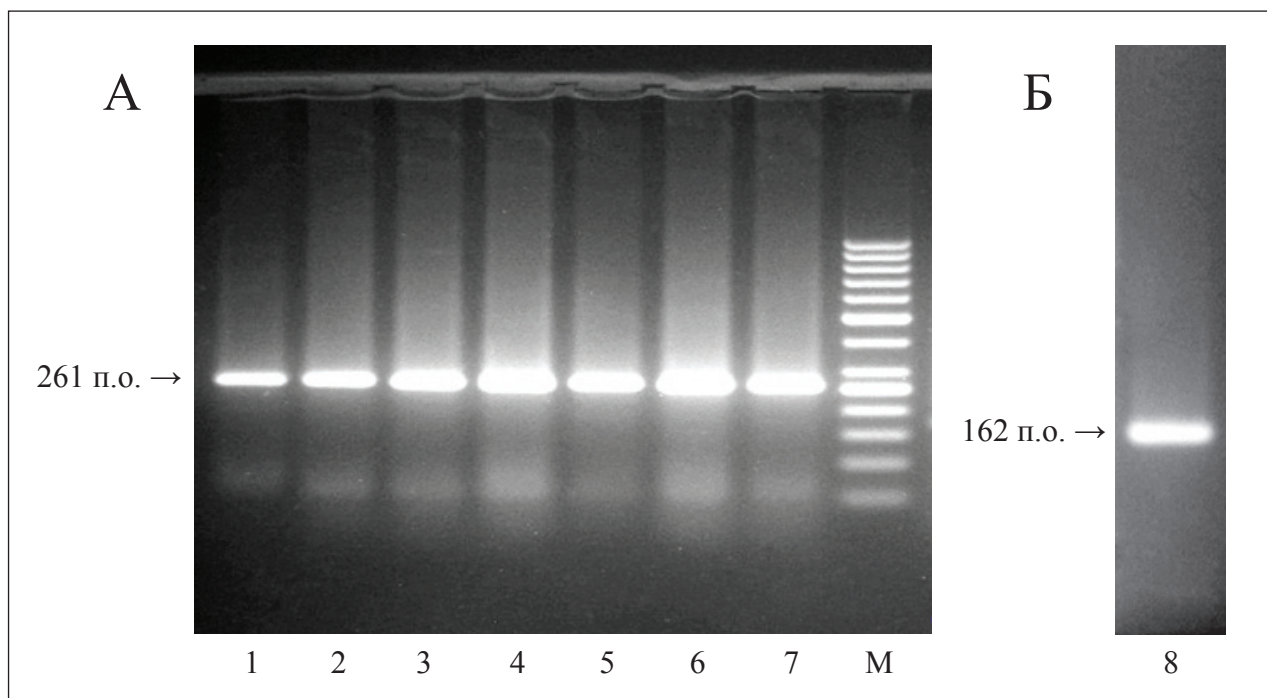


Рис. 2. Амплификация генов: а) *mdh*, б) *DT104*.

Дорожки 1–7 – *S. Typhimurium*; 8 – *S. Typhimurium* DT104; М – маркер молекулярной массы Gene Ruler™ 50 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва)

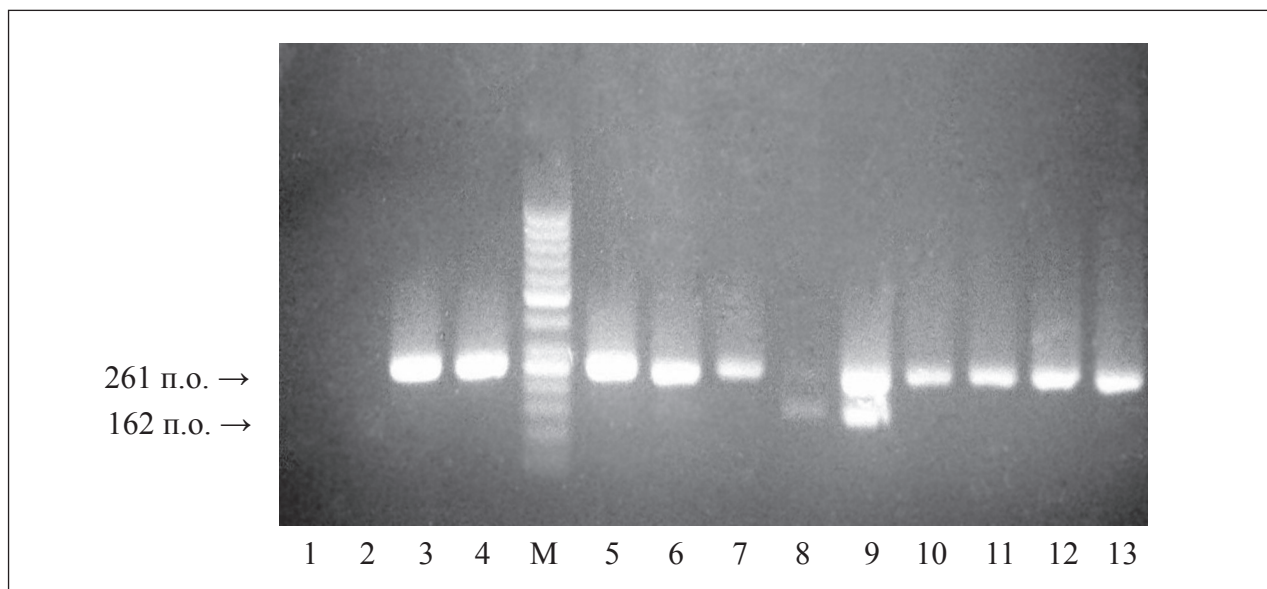


Рис. 3. Результаты дуплексной амплификации генов *mdh* и *DT104*.

Дорожки 3–7, 10–13 – *S. Typhimurium*; 9 – *S. Typhimurium* DT104; 1, 2 – *S. Enteritidis*; 8 – *S. Infantis*; М – маркер молекулярной массы Gene Ruler™ 50 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва)

Полученные нами данные коррелируют с данными других исследователей. Однако следует отметить, что в мире наиболее активно проводятся исследования по созданию быстрых и точных экспресс-методов, основанных на мультиплексной ПЦР для одновременной идентификации основных серовариантов сальмонелл.

Для идентификации наиболее распространенных клинических серотипов *S. enterica subsp. enterica*, выделенных в США, был разработан мультиплексный ПЦР-анализ, основанный на определении шести генетических локусов *S. Typhimurium* и четырех *S. Typhi* (2 мультиплексные ПЦР по 5 праймеров). Данный метод позволил идентифицировать 30 различных серотипов. Из них 22 серотипа дали уникальные образцы паттернов амплифицированных фрагментов. Другие 8 серотипов были сгруппированы в четыре пары, которые впоследствии были идентифицированы двумя дополнительными ПЦР. Авторы сравнили результаты, полученные от ПЦР-типирования, с обычным серотипированием и нашли, что ПЦР-типирование было почти столь же дискриминационным. 97% изученных штаммов были правильно идентифицированы [16].

Исследования, проводимые в университетах Италии и Испании, показали, что разработанный ими экспресс-метод для обнаружения и идентификации наиболее распространенных серовариантов сальмонелл, основанный на ПЦР-анализе генов *STY1599* и *fliC*, обладает высокой специфичностью и чувствительностью. Межлабораторная воспроизводимость данного метода составила 95,92% с индексом каппы 0,757 [10].

Sharon с соавт. при идентификации штаммов *S. enterica*, принадлежащих к сероварам *Typhimurium*, *Enteritidis*, *Dublin* и *Stanleyville* продемонстрировали, что предложенный метод ПЦР, основанный на определении генов, кодирующих О- и Н- антигены, обладает почти 100%-ной чувствительностью. Из 171 протестированного ими изолята 170 были правильно идентифицированы [17].

Японскими учеными установлено, что использование праймеров для обнаружения генов *fliB*, *mdcA*, *gatD*, *stn* и *STM4057* в мультиплексной ПЦР позволяет с 94,3%-ной точностью идентифицировать такие сероварианты *S. enterica subsp. enterica* как *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Minnesota*, *Panama*, *Amsterdam*, *Newport*, *Kentucky*, *Muenchen*, *Beaudesert*, *Montevideo*, а также сероварианты *S. bongori* [18].

Заключение

Актуальность проводимых исследований обусловлена высоким уровнем заболевания сальмонеллезом в Республике Беларусь, а также распространением на ее территории госпитальных полирезистентных штаммов *S. Typhimurium* служащих причиной вспышек внутрибольничного сальмонеллеза, характеризующегося тяжелым течением и генерализацией процесса. В результате про-

веденных исследований показана возможность идентификации *S. Typhimurium* на основании амплификации специфического для него гена жгутикового антигена *fliC* или гена малатдегидрогеназы (*mdh*). Установлено, что множественно резистентных к антибиотикам сальмонелл можно выявлять на основании присутствия у них генов фаготипа DT 104.

Список использованных источников

1. Crump, J.A The global burden of typhoid fever / J.A. Crump, S.P. Luby, E.D. Mintz // Bull World Health Organ. – 2004. – Vol. 82. – P. 346–353.
2. *Salmonella enterica* bacteraemia: a multinational population-based cohort study / K.B. Laupland [et al.] // BMC Inf. Dis. – 2010. – Vol. 10. – P. 95.
3. Geographic variations and temporal trends of Salmonella associated hospitalization in the U.S. elderly, 1991–2004: A time series analysis of the impact of HACCP regulation / K.K.H. Chui [et al.] // BMC Public Health. – 2009. – Vol. 9. – P. 447.
4. Близнюк, А.М. Этиологическая структура и проявление эпидемиологического процесса сальмонеллезом / А.М. Близнюк, И.И. Рашкевич, Г.Н. Чистенко // Журнал ГрГМУ. – 2010. – № 1. – С. 78–81.
5. Characterization of 13 multi-drug resistant Salmonella serovars from different broiler chickens associated with those of human iso-

- lates / H. Chiu [et al.] // BMC Inf. Dis. – 2010. – Vol. 10. – P. 86.
6. CDC. *Salmonella* surveillance: Annual summary, 2004. Centers for Disease Control and Prevention. – Atlanta, GA., 2005.
7. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS): Enteric bacteria / Atlanta: Centers for disease Control and Prevention. – 2001. – P. 121.
8. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 infections in the United States / M.K. Glynn // N. Engl. J. Med. – 1998. – Vol. 338. – P. 1333–1338.
9. Клональное распространение CTX-M-5 продуцирующих нозокомальных штаммов *Salmonella Typhimurium* в России, Беларуси и Казахстана / В.К. Козырева и др. // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2012. – Т. 14, № 1. – P. 38–50.
10. Intra- and inter-laboratory evaluation of an improved multiplex-PCR method for detection and typing of *Salmonella* / I. Martinez-Balless-teros [et al.] // J. Infect. Dev. Ctries. – 2012. – Vol. 6 (5). – P. 443–451.
11. Lin, J.S. Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella Typhimurium* in stool and food samples / J.S. Lin, H.Y. Tsen // J. Food Prot. – 1999. – Vol. 62, № 10. – P. 1103–1110.
12. Characterization of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and Monophasic *Salmonella* Serovar 1,4, [5], and 12: i: – Isolated in Tailand / P. Amavisit, W. Boonyawiwat, A. Bangtrakulnont // J. Clin. Microbiol. – 2005 – Vol. 43. – P. 2736–2740.
13. Сальмонеллы: молекулярные механизмы приспособленности и факторы вирулентности // Д.Г. Ахметова и др. // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 1. – С. 3–24.
14. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagelin (H-antigen) gene / W. Lei [et al.] // J. Bacteriol. – 2003. – Vol. 185, № 9. – P. 2936–2943.
15. Threlfall, E.J. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 – a truly international epidemic clone / E.J. Threlfall // J. Antimicrob Chemother. – 2000. – Vol. 46. – P. 7–10.
16. Multiplex PCR-Based Method for Identification of Common Clinical Serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* / S. Kim [et al.] // J. Clin Microbiol. – 2006. – Vol. 44(10). – P. 3608–3615.
17. Identification by PCR of non-typhoidal salmonella enterica serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali / M. Sharon [et al.] // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2010. – Vol. 4, № 3. – P. 152–159.
18. A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification / K. Lee [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 107. – P. 805–811.

Дата поступления статьи 30 апреля 2014 г.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ 1BL.1RS ТРАНСЛОКАЦИИ В КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ И ЛИНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

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

² РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»

Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Введение

Пшеница – один из наиболее важных видов злаков, культивируемых как в Беларуси, так и во всем мире. Современные сорта пшеницы – это результат обширной селекционной работы, направленной на совмещение нескольких признаков в одном организме (продуктивность, устойчивость к болезням, хлебопекарные качества и др.). На сегодняшний день важной задачей для селекционеров становится создание и выращивание сортов, устойчивых к различным фитопатогенным заболеваниям. Такими заболеваниями являются, например, стеблевая ржавчина, вызываемая *Puccinia graminis*; желтая ржавчина, вызываемая *Puccinia striiformis*; бурая ржавчина, вызываемая *Puccinia recondite*, и мучнистая роса, вызываемая *Erysiphe graminis* [1–3]. Устойчивость сортов пшеницы к данным заболеваниям является предпосылкой для получения стабильно высоких урожаев и вместе с тем экономически выгодна, поскольку восприимчивые сорта нуждаются в защите фунгицидами, что ведет к дополнительным финансовым затратам и загрязнению окружающей среды. Кроме того, фунгициды могут способствовать появлению устойчивых рас патогенов.

Большое внимание в селекции пшеницы уделяется созданию сортов, обладающих естественной устойчивостью к упомянутым выше заболеваниям. Она может быть обеспечена благодаря присутствию соответствующих генов [4]. По данным Булойчика и др., в сортах пшеницы, культивируемых в Беларуси, наиболее эффективными генами устойчивости к бурой ржавчине являются гены *Lr9*, *Lr19*, *Lr24* [5, 6], к мучнистой росе – *Pm7*, *Pm16*, *Pm17* и *Pm20* [5, 7].

Одним из успешных путей обогащения геноплазмы пшеницы генами устойчивости к болезням и вредителям стало получение пшенично-ржаных транслокаций или замещений [8–10].

У пшеницы мягкой зарегистрировано более 68 чужеродных транслокаций, несущих такие гены [10, 11]. Так, например, на сегодняшний день селекционерами выведены сотни сортов и линий пшеницы, содержащих 1RS транслокации генома ржи (*Secale cereale* L.). Среди них 1BL.1RS тип транслокации является одним из самых распространенных. Данный вид транслокации является эффективным донором комплексной устойчивости против грибных заболеваний [1, 10, 12, 13]. 1BL.1RS фрагмент хромосомы ржи несет гены устойчивости против бурой ржавчины (*Lr26*), стеблевой ржавчины (*Sr31*), мучнистой росы (*Pm8*), а также желтой ржавчины (*Yr9*), вируса полосатой мозаики (*Wsm*) и тли (*Gb*) [10, 12–14]. Источником 1BL.1RS транслокации является небольшое количество предковых сортов ржи. Для большинства сортов и линий, включая такие широко используемые сорта как «Кавказ» [1, 12, 13, 15] и «Аврора», донором указанной транслокации являлся сорт ржи «Petkus» [1, 16].

Выявление 1BL.1RS транслокации в сортах и линиях, используемых в белорусской селекции, представляет значительный практический интерес, поскольку данный тип транслокации может не только способствовать устойчивости сортов к комплексу болезней, но также и увеличению массы зерен, адаптивности сортов, и, как следствие, повышению их урожайности [12, 13, 17]. По данным Carver с соавторами, наличие в геноме пшеницы данного типа транслокации способствует повышению урожайности зерна до 10% [18, 19].

Целью представленного исследования было выявление источников 1BL.1RS транслокации генома ржи среди коллекционных сортов и линий озимой пшеницы. Для решения данной задачи были привлечены молекулярные маркеры, так как они могут обеспечить проведение быстрого и надежного анализа.

Материалы и методы

Семена сортов и линий озимой пшеницы были предоставлены лабораторией озимой пшеницы РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино).

ДНК из зерен выделяли по методу, предложенному Plaschke и др. [6, 20]. ДНК выделяли из двух зерновок для каждого сорта. Идентификацию 1BL.1RS транслокации проводили с помощью молекулярных маркеров PAWS5 и PAWS6, выявляемых в результате ПЦР [21]. Выявление в геноме пшеницы фрагмента 1R хромосомы ржи проводилось по методике, предложенной Weng et al. [1].

Состав реакционной среды для амплификации объемом 12,5 мкл был следующий: буфер

для *Taq* полимеразы «А» 1× без $MgCl_2$; $MgCl_2$, 1,5 мМ; НТФ, 0,2 мМ; праймеры, 0,25 нМ; *Taq*-полимераза, 0,5 ЕА; ДНК – 50 нг. Для анализа использовались праймеры и ПЦР реактивы производства компании «Праймтех» (Минск).

Для проведения амплификации была использована следующая программа: 1 цикл продолжительностью 5 мин при 94 °С; 35 циклов, включающих в себя: 30 с при 94 °С, 30 с при 55 °С, 1 мин при 72 °С, заключительное выдерживание – 7 мин при 72 °С. Визуализацию фрагментов амплификации проводили после разделения их методом электрофореза в триацетатном буфере при помощи системы документирования гелей GelDoc 2000.

Результаты и обсуждение

В результате амплификации образцов пшеницы с праймерами PAWS5 и PAWS6, позволяющими выявить 1BL.1RS ржаную транслокацию, образуются фрагменты ДНК размером 100, 220 и 320 п.н. Для выявления транслокации значение имеют фрагменты длиной 220 и 320 п.н. Образцы, в геноме которых присутствует транслокация 1BL.1RS, образовывали с указанными праймерами ПЦР продукт

размером 320 п.н. В тех сортах и линиях, в геноме которых фрагмент хромосомы 1RS отсутствует, образуется ПЦР продукт размером 220 п.н [1, 21].

Тестированию на наличие 1BL.1RS ржаной транслокации подверглись 64 сорта и 7 линий озимой пшеницы зарубежной и белорусской селекции. Результаты тестирования образцов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Распространение 1BL.1RS ржаной транслокации в геноме сортов и линий пшеницы

№	Название сорта/ линии	Наличие 1BL.1RS транслокации	№	Название сорта/ линии	Наличие 1BL.1RS транслокации
Сорта пшеницы					
1	Астет	–	16	Зарница	–
2	Березина	–	17	Зерноградка 8	–
3	Былина	–	18	Зерноградка 9	–
4	Гарант	–	19	Зерноградка 10	–
5	Дон 85	–	20	Зерноградка 11	–
6	Дон 93	–	21	Капитоль	–
7	Дон 95	–	22	Капылянка	–
8	Донская безостая	–	23	Кірія	–
9	Донская юбилейная	–	24	Конкурент	–
10	Донской маяк	–	25	Легенда	–
11	Донской сюрприз	–	26	Мелодья	+
12	Донщина	–	27	Мироновская 35	–
13	Дриада 1	–	28	Мироновская 65	+
14	Жемчужина лесостепи	+	29	Мироновская 67	+
15	Завет	–	30	Мироновская 808	–

Продолжение табл. 1

31	Московская 65	—	48	Brigadier	+
32	Московский карлик	—	49	Bussard	—
33	Памяти Калининко	—	50	Compliment	—
34	Подарок Дону	—	51	Elena	—
35	Полесская 87	—	52	Hadners	—
36	Прэм'ера	—	53	Jawa	—
37	Прэстыж	—	54	Juma	—
38	Ремесливна	—	55	Kobra	—
39	Ростовчанка	—	56	Kris	—
40	Саната	—	57	Lars	—
41	Спектр	—	58	Marabu	+
42	Сузор'е	—	59	Podolanka	—
43	Узлёт	—	60	Ritmo	—
44	Щара	—	61	Sakwa	—
45	Ятрань 60	—	62	Sukces	—
46	Bandit	—	63	Symfonia	—
47	Bison	—	64	Taras	—
Линии пшеницы					
1	ВИ 22	+	5	STH 729	+
2	Lutescens 13393	+	6	STH 1198	—/+
3	STH 48	—	7	STH 1498	—
4	STH 582	—			

Примечание. Знак «+» означает наличие 1BL.1RS транслокации, знак «—» — ее отсутствие.

Как видно из таблицы, фрагмент хромосомы 1RS несут 6 сортов и 4 линии пшеницы, что составляет 14% от общего количества тестируемых образцов. При этом линия STH 1198 оказалась неоднородной и имеет в своем составе как растения, в которых фрагмент 1RS хромосомы присутствует, так и те, в которых данного фрагмента нет.

Анализ родословной показывает, что в качестве родительских форм сортов «Мироновская 65» и «Мироновская 67» были использованы сорта «Мироновская 27» и «Мироновская 61», несущие в своем геноме 1BL.1RS транслокацию. Сорт «Мироновская 27», вероятнее всего, получил данную транслокацию от линии «Lutescens 6538». Сорт «Marabu» (получен в результате комбинации скрещиваний LP-6077-71 / Monopol // Kronjuwel) вероятнее всего получил фрагмент 1RS хромосомы от родительской формы «Kronjuwel», т. к. в сорте «Monopol» искомый фрагмент отсутствует. Для других сортов и линий, несущих в своих геномах 1BL.1RS транслокацию, либо неизвестны родительские формы, либо если роди-

тельские формы известны (как, например, для сорта «Brigadir»), то информация о наличии в их геномах транслокации в базе данных <http://www.genbank.vurv.cz/pedigree> отсутствует [23]. Проследить происхождение транслокации в этих сортах и линиях не удастся.

Можно прогнозировать, что сорта и линии, в составе которых выявлена 1BL.1RS транслокация, будут обладать устойчивостью к различным видам ржавчины, мучнистой росе и другим заболеваниям за счет генов, включенных в данный фрагмент ржаной хромосомы. В частности, показана эффективность отдельных генов, включенных в данную транслокацию, в условиях Беларуси [24]. Остальные сорта и линии, представленные в табл. 1, не несут в своем геноме указанную транслокацию, однако они могут проявлять устойчивость к заболеваниям за счет наличия в их геномах других генов, таких как *Lr1* (например, сорта Sakwa, Прэстыж и линия STH 582), *Lr10* (например, сорта Kris, Московский карлик и Kipria) и *Lr34* (например, сорта Зарница, Дон 93 и Дриада 1). Устойчивость

к мучнистой росе может быть обеспечена за счет гена *Pm3*, наличие которого было выявлено нами в таких сортах как Taras, Jawa и Донской маяк. Данные гены могут способствовать увеличению степени устойчивости к соответствующим расам фитопатогенов в соответствии с их эффективностью.

Кроме устойчивости к комплексу болезней, 1BL.1RS транслокация фрагмента ржаного генома приносит в геном пшеницы и ряд нежелательных свойств. Согласно отдельным литературным данным, присутствие в пшенице 1BL.1RS транслокации приводит к резкому снижению показателей хлебопекарного качества зерна [10]. Возникает вероятность того, что использование исходного материала с фрагментами ржаной хромосомы 1RS в селекционных программах по созданию новых сортов продовольственной пшеницы влечет за собой снижение хлебопекарных качеств.

Мы сравнили показатели хлебопекарного качества зерна отдельных сортов пшеницы, различающихся по содержанию 1BL.1RS транслокации. При помощи прямых и косвенных методов была проведена оценка технологических и хлебопекарных качеств зерна сортов озимой пшеницы с фрагментом ржаной хромосомы 1RS (Brigadir и Marabu) и сортов, у которых данный фрагмент отсутствует (Дон 93 и Капылянка). К прямому методу относится пробная выпечка хлеба, а к косвенным методам оценки – результаты исследований на альвеографе и фаринографе.

Косвенный метод оценки. Практически по всем основным технологическим характеристикам оба исследуемых сорта с фрагментом ржаной хромосомы имели более низкие значения. Так, содержание клейковины у сортов Капылянка и Дон 93 составило 29,2% и 30,2%, в то время как у сортов Marabu и Brigadir – 17,9% и 23,6% соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Технологическая характеристика сортов озимой пшеницы

Показатель	Название сорта			
	Капылянка	Дон 93	Marabu	Brigadir
Содержание клейковины, %	29,2	30,2	17,9	23,6
Время образования теста, мин	4,8	5,3	1,4	2,2
Устойчивость теста	7,9	8,3	1,4	3,4
Сила муки, е.а.	216	267	78	99
ВПС, %	59,2	57,3	50,3	54,8
Разжижение теста, е.ф.	59	66	102	107
Номер качества, е.ф.	100	98	22	46,5
Объем хлеба, мл	680	730	610	660
Общая оценка хлеба, балл	3,87	4,01	3,73	3,61

К одному из важных хлебопекарных качеств относится время образования теста. Данный показатель характеризует время от начала замеса до момента появления первых признаков разжижения гомогенного теста. Время образования теста важно в первую очередь при замесе теста в производственных условиях. У сорта озимой пшеницы Капылянка оно составило 4,8 мин (рис. 1), сорта Дон 93 – 5,3 мин, в то время как у сортов с фрагментами ржаной хромосомы время образования теста было в два-три раза ниже – 1,4 мин у сорта Marabu (рис. 2) и 2,2 мин у сорта Brigadir.

При этом для хлебопекарной промышленности также важна продолжительность по време-

ни другого показателя – устойчивости теста, поскольку, чем она выше, тем лучше тесто переносит воздействие сильного брожения и механической обработки. Сорта озимой пшеницы Капылянка и Дон 93 вновь показали лучшие значения признака. Длительность сохранения максимальной консистенции составила 7,9 и 8,3 мин соответственно, в то время как у сортов с фрагментами ржаной хромосомы – 1,4 мин (Marabu) и 3,4 мин (Brigadir) (рис. 1 и 2).

Как известно, химический состав муки находится в прямой зависимости от химического состава зерна, в то время как химический состав зерна зависит от селекционных осо-

бенностей сорта, поэтому с целью изучения состояния углеводно-амилазного комплекса муки у селекционных образцов озимой пшеницы проведено изучение изменения вязкости мучно-водной суспензии на амилографе.

Вязкость максимальной клейстеризации у сортов Капылянка и Дон 93 была в три раза выше, чем у сортов с ржаной транслокацией. Так, если у сортов Капылянка и Дон 93 значения данного признака составили 216 и 267 е.а., то у сортов Marabu и Brigadir – 78 е.а. и 99 е.а. соответственно.

Водопоглотительная способность у сортов без фрагмента ржаного генома также оказалась выше – 57,3–59,2%, в то время как у сортов с ржаной транслокацией – 50,3–54,8%.

Тесто из муки сильной высококачественной пшеницы, как известно, должно иметь показатель разжижения не более 80 единиц

фаринографа (е.ф.). У сортов без хромосомы ржи данный показатель составил 59 е.ф. (Капылянка) и 66 е.ф. (Дон 93), в то время как в сортах с ржаной транслокацией – 102–107 е.ф., что свидетельствует о том, что сорта Marabu и Brigadir относятся к группе слабых пшениц.

Показатель «номер качества» также является мерой качества муки. Низкий номер качества характерен для слабой муки, в то время как сильная мука размягчается поздно и медленно и, следовательно, характеризуется высоким номером качества. Из данных табл. 1 видно, что вновь наиболее высокое качество муки было у сортов Капылянка и Дон 93 у которых значения признака составили 100 и 98 е.ф. соответственно, в то время как у сортов с ржаной хромосомой – 22,0 е.ф. (Marabu) и 46,5 е.ф. (Brigadir).

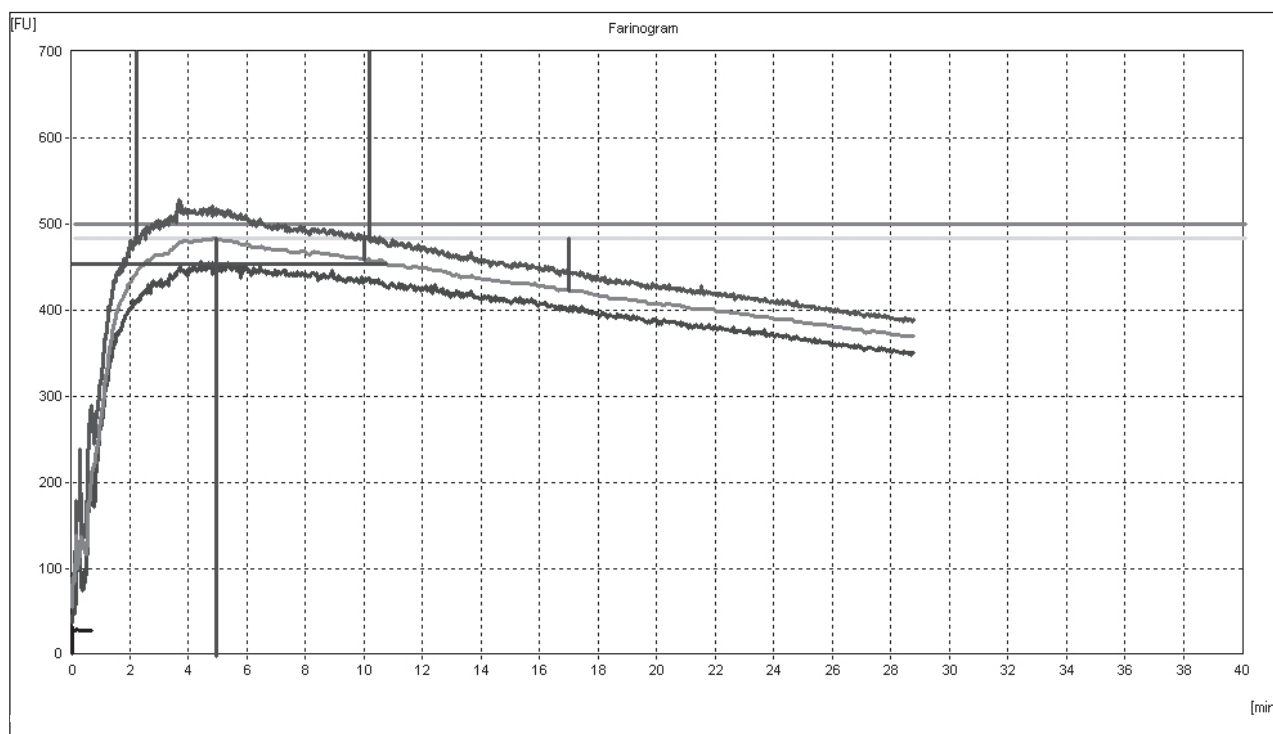


Рис. 1. Время образования теста и длительность сохранения максимальной консистенции у сорта озимой пшеницы Капылянка

Прямой метод оценки. По признаку «общая хлебопекарная оценка» более высокие значения признака снова показали сорта Капылянка и Дон 93 – 4,01 и 3,87 балла соответственно, в то время как у сортов с ржаной хромосомой оценка хлеба составила 3,61 балл (Marabu) и 3,73 балла (Brigadir). Характеристика признака с двумя знаками после запятой обусловлена тем, что признак

«общая оценка хлеба» это комплексный показатель, включающий: внешний вид хлеба (форма хлеба, цвет корки, характеристика поверхности хлеба), пористость и эластичность хлеба, цвет мякиша, вкус и запах хлеба, а также его объемный выход. По этому признаку наиболее высокие значения были у сорта Дон 93 (730 мл), а наиболее низкие у сорта Marabu – 610 мл (рис. 3).

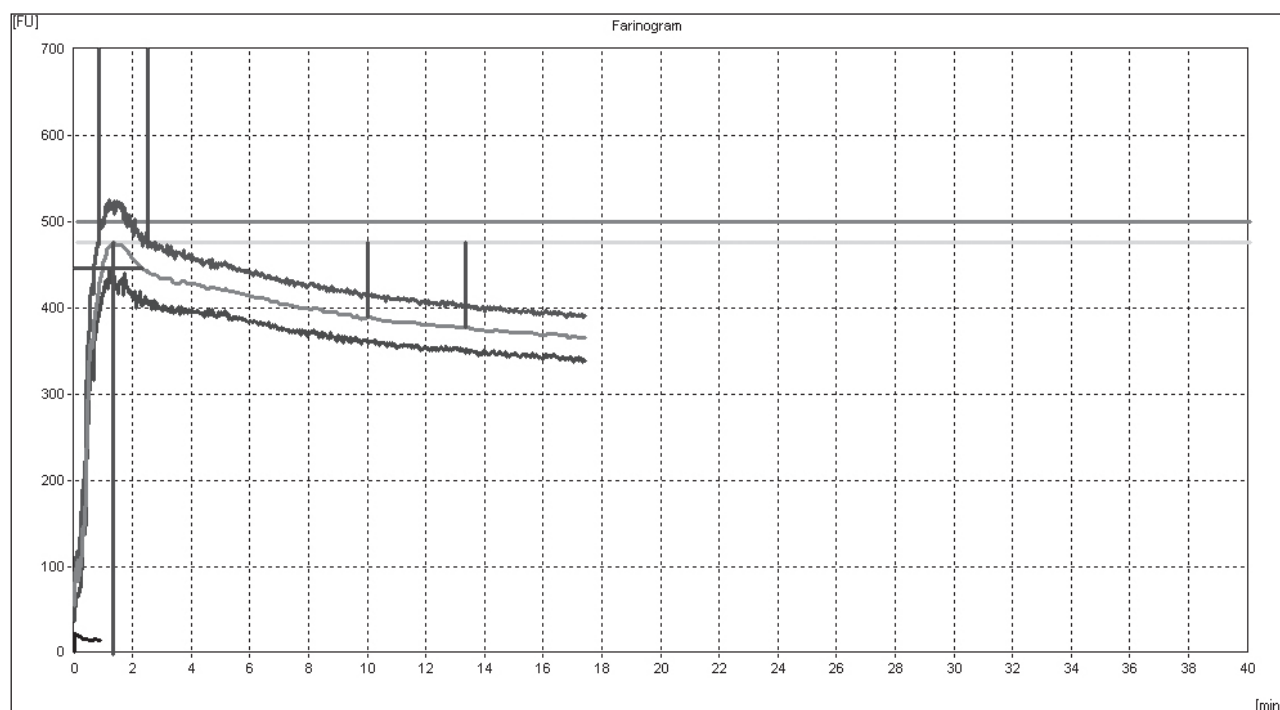


Рис. 2. Время образования теста и длительность сохранения максимальной консистенции у сорта озимой пшеницы Marabu

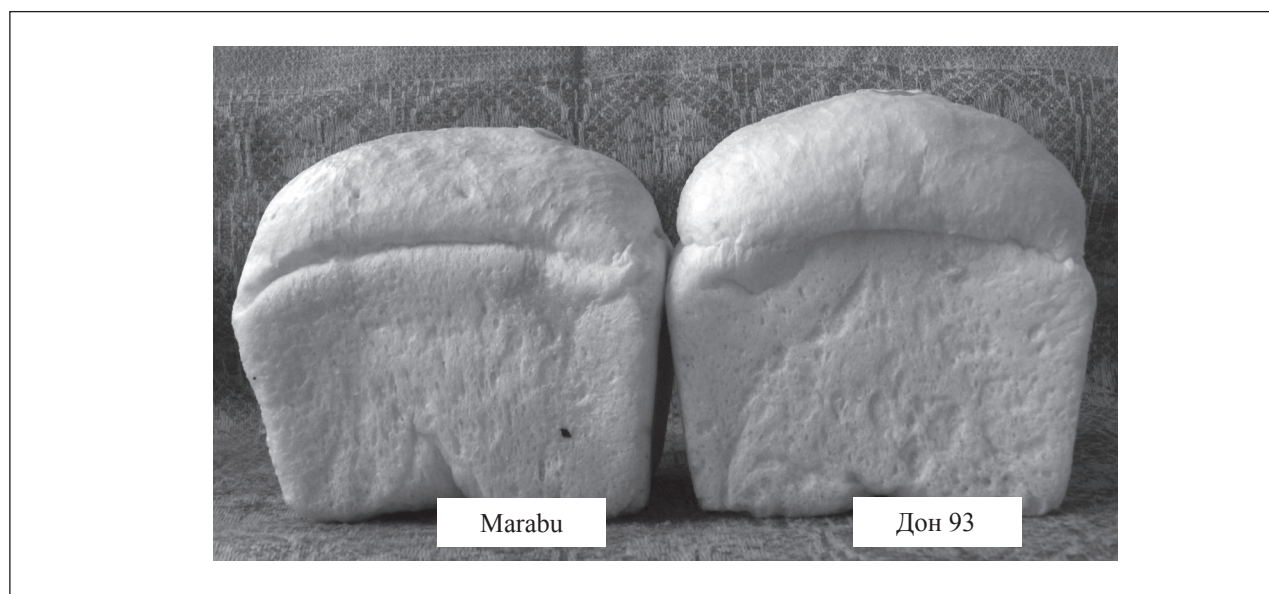


Рис. 3. Образцы хлеба из зерна сортов Дон 93 и Marabu

Однако стоит учесть, что кроме наличия ржаной транслокации 1BL.1RS, сорта Капылянка, Дон 93, Brigadir и Marabu могут отличаться и по составу других генов, влияющих

на хлебопекарные качества пшеницы. Поэтому при оценке потенциала сорта по хлебопекарным качествам важно учитывать присутствие в геноме этих генов, в частности глютелинов.

Заключение

Таким образом, проведенный анализ позволил выявить потенциальные источники 1BL.1RS транслокации хромосомы ржи сре-

ди коллекционного материала сортов и линий пшеницы. Они могут быть использованы в селекционном процессе в качестве доно-

ров устойчивости к болезням, адаптивности, урожайности. По хлебопекарным качествам отдельные сорта с 1BL.1RS транслокацией могут уступать другим сортам. Они наиболее

пригодны для использования в кондитерской промышленности [21], где требования, предъявляемые к исходному сырью, ниже, или для производства фуражного зерна [22].

Список использованных источников

1. Weng, P.A.Y. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background / P.A.Y. Weng, R.N. Devkota, J.C. Rudd // *Plant Breeding*. – 2007. – Vol. 126. – P. 482–486.
2. Tsunewaki, K. Genetic studies of a 6-derivative from an 8 triticales / K. Tsunewaki // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1964. – Vol. 6. – P. 1–11.
3. Zeller, J.F. 1B/1R wheat-rye substitutions and translocations / J.F. Zeller // *4th Intl Wheat Genet Symp.* – 1973. – P. 209–221.
4. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием молекулярных маркеров / О.Ю. Урбанович [и др.] // *Генетика*. – 2006. – Vol. 42, № 5. – P. 675–683.
5. Булойчик, А.А. Влияние чужеродных хромосом на устойчивость мягкой пшеницы к биотрофным грибным патогенам / А.А. Булойчик, Е.А. Волуевич // *Цитология и генетика*. – 2008. – № 1. – P. 13–20.
6. Булойчик, А.А. Изменение частоты встречаемости генов вирулентности в белорусской популяции *Puccinia triticina* Eriks. в 1980, 1984 и 1994 гг. / А.А. Булойчик, Е.А. Волуевич // *Микология и фитопатология*. – 1997. – Vol. 31, № 5. – P. 55–59.
7. Эффективность генов устойчивости к мучнистой росе мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в Беларуси / А.А. Булойчик [и др.] // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2006. – № 3. – P. 51–56.
8. Rabinovich, S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. / S.V. Rabinovich // *Euphytica*. – 1998. – Vol. 100. – P. 323–340.
9. Достижения отдела селекции и семеноводства пшеницы и тритикале к 100-летию академика П.П. Лукьяненко / Ф.А. Колесников [и др.] // *Пшеница и тритикале: Мат. научнотехн. Конфер. «Зеленая эволюция П.П. Лукьяненко»*. – 2001. – P. 13–27.
10. Устойчивость коммерческих сортов пшеницы озимой против бурой ржавчины в условиях северо-восточной лесостепи Украины / В.А. Власенко [и др.] // *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Агрономія і біологія»*. – 2012. – Vol. 23, № 2. – P. 161–167.
11. Рыбалкин, П.Н. Развитие идей хлебного батьки / П.Н. Рыбалкин // *Пшеница и тритикале: Мат. научнотехн. Конфер. «Зеленая эволюция П.П. Лукьяненко»*. – 2001. – P. 6–13.
12. Evaluation of Pakistani elite wheat germplasm for T1BL.1RS chromosome translocation / H.B.R. Tahir [et al.] // *J. Agr. Sci. Tech.* – 2014. – Vol. 16. – P. 421–432.
13. Mujeeb-Kazi, A. Homozygous 1B and 1BL/1RS chromosome substitutions in *Triticum aestivum* and *T. turgidum* cultivars / A. Mujeeb-Kazi, M.D.H.M. William, M.N. Islam-Faridi // *Cytologia*. – 1996. – Vol. 61. – P. 147–154.
14. William, M.D. Rapid detection of 1B, 1BL/1RS heterozygotes in the development of homozygous 1BL/1RS translocation stocks of *Triticum turgidum* ($2n=4x=28$) / M.D. William, A. Mujeeb-Kazi // *Genome*. – 1993. – Vol. 36. – P. 1088–1091.
15. Trethowan, R.M. Novel germplasm resources for improving environmental stress tolerance of hexaploid wheat / R.M. Trethowan, A. Mujeeb-Kazi // *Crop Sci.* – 2008. – Vol. 48. – P. 1255–1265.
16. Schlegel, R. About the origin of 1RS.1BL wheat-rye chromosome translocations from Germany / R. Schlegel, V. Korzun // *Plant Breed.* – 1997. – Vol. 116. – P. 537–540.
17. Villareal, R.L. Agronomic performance of related durum wheat (*Triticum turgidum* L.) stocks possessing the chromosome substitution T1BL.1RS / R.L. Villareal, O. Bañuelos, A. Mujeeb-Kazi // *Crop Sci.* – 1997. – Vol. 37. – P. 1735–1740.
18. Carver, B.F. Comparison of related wheat stocks possessing 1B or 1RS/1BL chromosomes – agronomic performance / B.F. Carver, A.L. Rayburn // *Crop Science*. – 1994. – Vol. 34, № 6. – P. 1505–1510.

19. Dimitrijević, M. The effect of wheat-rye translocation 1BL.1RS in a different quality genetic background on biological traits in wheat / M. Dimitrijević, J.S. Petrovi, P. Gustafson // *Genetika*. – 2008. – Vol. 40, № 3. – P. 261–270.
20. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers / J. Plaschke [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1995. – Vol. 91. – P. 1001–1007.
21. Rogowsky, P.M. Structural heterogeneity in the R173 family of rye-specific repetitive DNA sequences / P. M. Rogowsky [et al.] // *Plant Mol. Biol.* . – 1992b. – Vol. 20. – P. 95–102.
22. Кулинкович, С.Н. Озимая пшеница: как не «заблудиться» в разнообразии сортов / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://mshp.gov.by/arekomendacii/zs/2009/sortpshen/sortpshenici300709.htm>.
23. Pedigree and Identified Alleles of Genes [Electronic resource]. – Mode of access: <http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/>.
24. Молекулярная идентификация и эффективность генов устойчивости Lr26/Pm8 в сортообразцах мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) / А.А. Булойчик [и др.] // *Весці НАН Беларусі. Сер.біял. навук.* – 2014. – № 2. – P. 60–63.

Дата поступления статьи 3 мая 2014 г.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР-ПДРФ МЕТОДА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МУТАЦИИ G143A УСТОЙЧИВОСТИ К СТРОБИЛУРИНАМ В ИЗОЛЯТАХ ВОЗБУДИТЕЛЯ СЕПТОРИОЗА ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ

¹ ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

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

² РУП «Институт защиты растений НАН Беларуси»

Республика Беларусь, 223011, Минский р-н, д. Прилуки, ул. Мира, 2

Введение

Септориоз (пятнистость) листьев пшеницы является одним из самых распространенных и вредоносных заболеваний этой культуры во всем мире, включая Европу, Северную и Южную Америку, Австралию. Он вызывается грибом *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröter., принадлежащим к отряду *Ascomyceta* (сумчатые грибы). Патоген поражает как мягкую, так и твердую пшеницу [1–3]. Предполагают, что он возник вместе со своим основным растением-хозяином (пшеницей) в странах Плодородного полумесяца [4] и распространился в другие страны мира с помощью переносимых ветром аскоспор и/или инфицированных тканей растений. В условиях эпифитотии септориоз способен привести к серьезным потерям урожая зерна: до 40% [5] и даже до 60% у некоторых сортов пшеницы [6]. В Беларуси эта болезнь распространена достаточно широко и является весьма вредоносной [7].

Для контроля патогена используют различные методы. Наряду с созданием генетически устойчивых сортов, применяют различные агротехнические мероприятия, из которых наиболее эффективна обработка вегетирующих растений фунгицидами, в частности системными фунгицидами, принадлежащими к группе стробилуринов (QoIs ингибиторов) [8, 9]. Стробилурины, новейший класс фунгицидов для контроля грибных патогенов растений, широко используются в растениеводстве. К этому классу относятся 8 различных фунгицидов, зарегистрированных в 85 странах мира для использования на более чем 80 сельскохозяйственных культурах, в том числе и один из самых продаваемых в мире препаратов азоксистробин [10]. Однако отмечено быстрое развитие устойчивости в популяциях патогенов к

фунгицидам данного класса. Так, например, было показано, что частота устойчивых изолятов возбудителя мучнистой росы ячменя *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* может увеличиться от 2% до 58% в течение одного сезона после трех применений фунгицидов [11]. В ряде исследований показано, что у разных видов *Mycosphaerella* устойчивость к стробилуринам также развивалась очень быстро [12, 13, 14]. Впервые она была обнаружена ретроспективно в Великобритании в 2001 г. на обработанных фунгицидами полях пшеницы с очень низкой частотой встречаемости резистентных изолятов [15], а затем, в 2002 г., резистентность была отмечена уже в пяти европейских странах [16]. В 2003 г. частота и распространение резистентности резко увеличились в различных географических регионах континента, достигая особенно высоких уровней в странах северной Европы [16]. Мониторинг популяций *M. graminicola* в Западной Европе в течение последних 20 лет показал медленный, но постоянный сдвиг в сторону уменьшения чувствительности гриба к стробилуринам [16–19]. По данным мониторинга, проведенного в 2007–2009 гг. во Франции, изоляты дикого типа, чувствительные к действию фунгицидов, почти полностью исчезли.

Степень риска, связанного с устойчивостью к фунгицидам, зависит от механизма действия активного вещества препарата, методологии использования фунгицидов и от эволюционного потенциала гриба, против которого применяется средство химзащиты [5, 6]. Особенность класса стробилуринов заключается в том, что их действие нацелено не на ядерные гены, как у большинства современных фунгицидов, а на митохондриальный геном.

Эти фунгициды ингибируют митохондриальное дыхание у грибов в результате остановки переноса электронов в дыхательной цепи на участке цитохром *bc1* белкового комплекса (комплекса III), что приводит к возникновению дефицита энергии из-за отсутствия аденозинтрифосфата (АТФ) [10, 21]. Так как митохондриальное дыхание требуется всем грибам, стробилурины эффективны против широкого спектра грибных патогенов растений, включая аскомицеты, базидиомицеты и дейтеромицеты, а также оомицеты.

У большинства патогенов, в том числе *M. graminicola*, устойчивость к стробилуринам обусловлена однонуклеотидным полиморфизмом в митохондриальном гене *cyt b* [12, 13, 22]. При наличии этой точковой мутации гуанин замещается на цитозин в кодоне 143, что приводит к замене глицина на аланин (G143A) в белке цитохром *b* [23]. Данная мутация препятствует связыванию стробилурина на участке, являющемся мишенью действия фунгицида, что приводит к восстановлению способности митохондрий гриба к дыханию. Резистентность изолятов за счет мутации G143A позволяет им выжить при обработках стробилурином в концентрации в 100 раз выше, чем требуется для гибели чувствительных изолятов. Было показано, что в популяциях некоторых патогенов мутация в гене *cyt b* присутствовала еще до того, как были введены в обращение QoIs фунгициды, то есть она возникает спонтанно, однако существенное накопление этой мутации в популяции патогенов обусловлено давлением отбора, оказываемым фунгицидом [22]. Попытка снизить такое давление в популяциях *M. graminicola* использованием ряда агрохимических приемов, оказалась малоуспешной. Так уровень устойчивости гриба к стробилуринам за счет распространения митохондриальной мутации G143A в Великобритании увеличился с 35% до 80% в 2003–2004 гг. Аналогичную тенденцию наблюдали и в других северо-западных европейских странах [24, 25]. Быстрое распространение митохондриальных гаплотипов, характеризующихся наличием мутации G143A, в Европе (с 8-ми в 2002 г. до 24-х к 2004 г.) позволило предположить, что это последствие нескольких независимых мутационных событий. Действительно, было показано, что устой-

чивость к стробилуринам появилась независимо, в результате, по меньшей мере, четырех повторяющихся мутаций в том же самом сайте цитохрома *b*, а не путем перемешивания различных генетических фонов через половую рекомбинацию [26, 27]. Выявлено, что повторяющиеся независимые мутации приводили к появлению аллеля резистентности к QoIs в различных географических районах на разных генетических фонах. После этого частота устойчивых гаплотипов гриба увеличивалась в результате сильного отбора фунгицидом, и устойчивые изоляты распространялись аскоспорами с помощью ветра [27], создавая поток генов в направлении с запада на восток.

Биологические особенности *M. graminicola* способствуют быстрому распространению устойчивых к фунгицидам гаплотипов. Это гаплоидный, гетероталлический аскомицет, воспроизводящийся как половым (аскоспорами), так и бесполом (пикнидиоспорами) путем. В течение одного вегетационного периода растения-хозяина (пшеницы) он может дать несколько генераций. При этом гриб сохраняется и выживает на растительных остатках (на листьях и стерне), передаваясь из одного сезона в другой. Половое размножение играет важную роль в генетическом разнообразии популяций *M. graminicola*, в результате чего патоген характеризуется высокой биологической приспособленностью [28]. Молекулярно-генетический анализ популяций *M. graminicola* показал высокий поток генов внутри и между популяциями [29–31]. Генетические популяционные исследования, основанные на экспериментах, проведенных в полевых условиях, показали, что патоген может значительно измениться в течение одного вегетационного периода в соответствии с генотипами растения-хозяина [32]. Это объясняет, почему даже очень низкие частоты мутации устойчивости в гене *cyt b* в исходной популяции могут привести к быстрой потере эффективности QoIs [15]. Изучение характера наследования устойчивости *M. graminicola* к стробилуринам показало, что чувствительные к фунгициду изоляты выступают при размножении гриба в качестве отцовского родителя. В результате этого появляющиеся потомки, несущие мутацию в митохондриальном геноме, передающемуся от материнского родителя,

являются устойчивыми к стробилюринам. Данный процесс не зависит от различий в приспособленности и наследовании ядерных генов, которое проходит в соответствии с менделевской схемой расщепления [33]. Таким образом, быстрое распространение мутации G143A и развитие резистентности к стробилюринам у *M. graminicola* во многих странах Европы определяется высокой частотой точечных мутаций, затрагивающих один сайт и материнским наследованием признака резистентности у этого гермафродитного, биполярного, гетероталлического гриба [33].

Особенности наследования мутации G143A, приводящей к быстрому развитию резистентности к фунгицидам среди популяций *M. graminicola*, указывают на необходимость мониторинга ее распространения в регионах выращивания зерновых культур, в частности на посевах пшеницы. Проведение такого мониторинга с помощью фитопатологических тестов достаточно трудоемко, дорогостояще и требует значительных затрат времени, что усложняет задачу. Torgiani с соавторами предложили метод ПЦР-ПДРФ

детекции мутации G143A в изолятах *M. graminicola* [27, 34]. Они показали его достаточно высокую эффективность для оценки развития устойчивости в различных регионах западной Европы и определения путей миграции этой мутации. В Беларуси молекулярно-генетические исследования по изучению мутаций, определяющих устойчивость к фунгицидам у фитопатогенных грибов, ранее не проводились, несмотря на высокую эффективность методов ПЦР-диагностики, показанную в различных областях, и значимость такой диагностики для оптимизации химической защиты от патогенов сельскохозяйственных культур. В связи с этим, задачей данного исследования была разработка методологии оценки изолятов гриба *M. graminicola* на наличие мутации G143A, включавшей как оптимизацию методики выделения и очистки ДНК гриба, так и подбор оптимальных условий проведения ПЦР-ПДРФ анализа. В задачи исследования также входило выявление мутации среди изолятов гриба из коллекции Института защиты растений НАН Беларуси, собранных в разных регионах страны.

Материалы и методы

Для отработки метода ПЦР-диагностики устойчивости *M. graminicola* к стробилюринам использовали пять литовских изолятов гриба, которые были охарактеризованы зарубежными исследователями как резистентные и чувствительные к стробилюринам на основе биотеста. Эти изоляты были предоставлены сотрудникам РУП «Институт защиты растений НАН Беларуси» (ИЗР НАНБ), чтобы их можно было использовать в качестве положительных и отрицательный контролей данного признака в настоящих молекулярно-генетических исследованиях. Диагностику наличия мутации G143A осуществляли с использованием маркера *Mgcytb/Fnu4HI* (*SatI*) [34] у 85 изолятов, собранных в разных регионах Беларуси с пораженных болезнью сортов мягкой пшеницы сотрудниками ИЗР НАНБ.

Мицелий гриба выращивали на твердой агаризованной среде способом нанесения инокулюма наплывом слоя жидкой питательной среды, содержащей споры, на твердый слой (первый способ) и нанесением инокулюма микробиологической петлей на твердую питательную среду (второй способ). Выделение

и очистку ДНК из мицелия гриба после его растирания в жидком азоте осуществляли с использованием стандартного набора «Genomic DNA Purification Kit» (Thermo scientific EU) по модифицированной нами методике.

Наличие мутации G143A устойчивости к стробилюринам у изолятов *M. graminicola* определяли методом ПЦР-ПДРФ. Использовали пару праймеров *MgcytbF/R*: *MgcytbF* 5'TCGTTACTGGTG TTACACTTGC 3' и *MgcytbR* 5'GCCATAACATAATTCTCGCTGT-CACC3' с последующей рестрикцией полученного амплифицированного фрагмента эндонуклеазой *Fnu4HI/SatI* (Thermo scientific EU). Праймеры синтезированы в ОДО «Праймтех» (г. Минск, Беларусь).

Базовые условия ПЦР соответствовали [34] с последующей модификацией, экспериментально адаптированной для использованных нами реактивов и модели термоциклера. Для получения ПЦР-фрагментов на основе большинства препаратов ДНК использовали *Bio-Taq*-полимеразу производства Dialat (г. Москва, Россия) с сопутствующими реактивами для ПЦР этого же производителя.

Реакционная смесь в конечном объеме включала: препарат ДНК в концентрации от 50 до 100 нг; $MgCl_2$ – 1,8 мМ; каждого из dNTP – по 0,1 мМ; праймеров (прямого и обратного) – по 0,2 мкМ (200 нМ); BioTaq-ДНК-полимеразу – 1 ед; однократный буфер для BioTaq-ДНК-полимеразы (166 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 670 мМ Tris-HCl pH 8,8 при 25 °C и 0,1% Tween-20) с доведением объема до конечного деионизированной водой. Предложенная [34] программа для ПЦР оказалась приемлемой для использования на термоциклере GenAmp PCR System 2700 (2720), Applied Biosystems, США и позволяла получать воспроизводимый результат. Программа включала начальную денатурацию в течение 2 мин при 96 °C; далее 35 циклов по 60 с при 96 °C, 60 с при 50 °C и 1 мин при 72 °C; финаль-

ную элонгацию в течение 5 мин при температуре 72 °C. В результате амплификации получали специфический продукт размером около 650 п.н.

Рестрикцию продукта ПЦР осуществляли в соответствии со следующим протоколом: реакционная смесь объемом 15 мкл содержала 10 мкл ПЦР-продукта, 0,4 мкл рестриктазы *SatI* (*Fnu4HI*) и 2 мкл рекомендуемого для этой рестриктазы G-буфера 10× с доведением объема до конечного деионизированной водой. Реакцию рестрикции проводили в термостате при 37 °C в течение 16 часов. Размеры продуктов рестрикции определяли при горизонтальном электрофорезе в 2%-ном агарозном геле при напряжении тока 80 V в течение 1 ч с использованием маркера молекулярного веса «Сибэнзим» (Россия) 100–1000 п.н.

Результаты и обсуждение

В нашей стране молекулярно-генетическая диагностика грибов рода *Mycosphaerella* проводилась впервые, поэтому одной из задач исследования была отработка методики получения препаратов ДНК патогенного гриба в количестве и качестве, удовлетворяющем целям эксперимента и позволяющем осуществлять диагностику наличия хозяйственно значимых мутаций у любого коллекционного образца. Было определено, что для успешного выделения тотальной ДНК в концентрации, дающей возможность идентифицировать митохондриальную мутацию, достаточно мицелия, выращенного в одной микробиологической чашке Петри. При этом способ нанесения инокулюма наплывом слоя жидкой питательной среды, содержащей споры, на твердый слой, или нанесением инокулюма микробиологической петлей на твердую питательную среду, особой роли не играл. Однако второй способ был более предпочтительным, т.к. позволял собирать с поверхности чистый и сухой мицелий, что при выделении ДНК путем растирания в жидком азоте позволяло добиться лучшего результата при гомогенизации и разрушении клеточных стенок гриба.

Из литературы известны случаи неудач при получении препаратов ДНК патогенных грибов. Используемая нами методика выделения и очистки ДНК с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» после предварительного разрушения клеток мицелия в жидком азоте дала возможность получить качественные препараты ДНК у всех изучаемых изолятов. Однако

для получения гарантированного результата в стандартную методику, предлагаемую производителем, следует внести ряд модификаций. В частности, мы увеличили время лизиса с рекомендуемых производителем 5 до 20 минут, что позволяет достичь гораздо лучшего лизиса клеток грибных гиф, содержащих хитин. Нами также увеличено время центрифугирования гомогената после обработки его хлороформом с рекомендуемых 2 мин при 10 000 об/мин, что оказалось недостаточным при выделении ДНК из мицелия грибов, до 15 мин при 12 000 об/мин. Также было необходимо увеличить до 15 мин и время центрифугирования после осаждения. При меньшем времени центрифугирования преципитата «таблетка» может не образоваться, а ДНК в виде длинных тяжей вылиться вместе с водной фракцией. Для окончательного осаждения ДНК мы рекомендуем использовать не этанол, как описано в стандартной методике, прилагаемой к набору, а изопропанол с добавлением 45 мкл пятимолярного раствора ацетата аммония, и осаждение проводить в морозильной камере (минус 20°C) в течение 18–24 часов. Период замораживания можно исключить или сократить до 10–20 мин, однако выход ДНК при этом может существенно понизиться. Данная модифицированная методика позволяет получать при оптимальном количестве исходного материала каждого изолята до 3000 нг/мкл очищенного препарата ДНК гриба, пригодного не только для ампли-

фикации с использованием специфического праймера, но и для других целей, например, для идентификации генотипов или популяционных исследований с помощью произвольных праймеров. На рис. 1 приведен пример исполь-

зования ISSR-праймера UBC857 для оценки качества препаратов тотальной ДНК, полученных при описанном выше модифицированном способе ее выделения, и полиморфизма изолятов *M. graminicola* литовского происхождения.

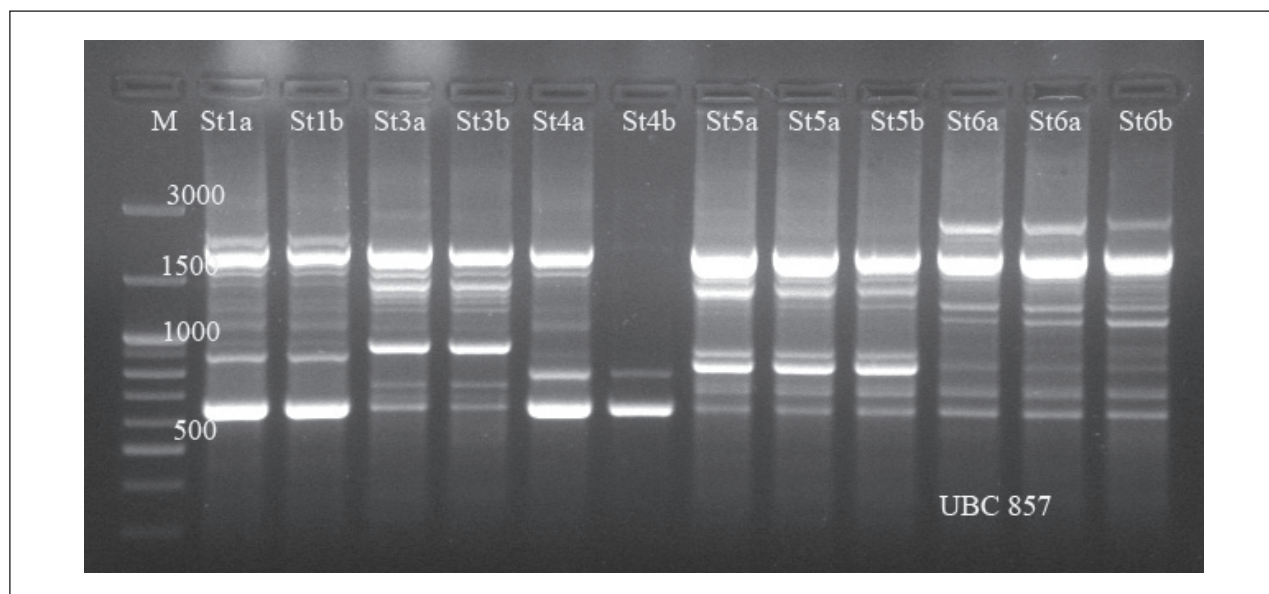


Рис. 1. Результаты разделения методом электрофореза продуктов амплификации ДНК литовских изолятов *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) с произвольным ISSR-праймером UBC 857

М – маркер молекулярного веса 100–3000 п.н.; St1–St6 ДНК взята от соответствующих изолятов гриба; а – размножение гриба при нанесении спор на агар микробиологической петлей; b – размножение гриба нанесением спор в виде суспензии в полужидком агаре

Для выявления митохондриальной мутации резистентности к фунгицидам G143A нами была использована пара ПЦР-праймеров MgcytbF/R с последующим разрезанием амплифицированного фрагмента эндонуклеазой *Fnu4HI* (*Sat1*). Условия ПЦР-реакции, предложенные [34], в целом, оказались приемлемыми для использования в наших условиях, однако при амплификации ДНК некоторых генотипов наблюдалось появление неспецифических фрагментов, которые впоследствии могли помешать правильной интерпретации результатов рестрикции. Снижение в реакционной смеси концентрации $MgCl_2$ с 2 до 1,8 мМ и повышение концентрации нативной ДНК с 10 до 50–60 нг позволило воспроизводимо получать один фрагмент размером 652 п.н.

После рестрикции амплифицированного фрагмента эндонуклеазой *Fnu4HI* (*Sat1*) наблюдается получение двух фрагментов молекулярным весом 442 и 210 п.н. у образцов, чувствительных к действию фунгицида, и трех

фрагментов весом 298 п.н., 210 п.н. и 144 п.н. у изолятов, несущих мутацию G143A. Несмотря на то, что по данным биотеста зарубежных коллег из Литвы среди предоставленных ими пяти изолятов присутствовали устойчивые к фунгициду генотипы, не было выявлено ни одного изолята с митохондриальной мутацией G143A (рисунок 2А). Причина этого явления, по нашему мнению, – высокая вариабельность базовой резистентности к стробилуринам изолятов *M. graminicola*, что неоднократно отмечалось в научной литературе [26, 27], и, вероятно, недостаточная эффективность использованного биотеста по этой причине.

Для повышения эффективности выявления мутационной изменчивости у грибов, приводящей к развитию резистентности к химическим средствам защиты растений, разработаны разные молекулярно-генетические методы, основанные на анализе не только мутации в митохондриальном гене, как в настоящем исследовании, но и ряда мутаций в ядерных

генах, являющихся мишенями для разных фунгицидов. Например, сообщалось об исследованиях нуклеотидной последовательности ядерного гена, контролирующего фермент диметилазу, в связи с развитием устойчивости к азолам (DMIs) у изолятов *M. graminicola* [35–37]. При проведении некоторых исследований можно использовать метод РТ-ПЦР (ПЦР в реальном времени) в случае наличия однонуклеотидных замен (SNP), что уже сообщалось и в отношении мониторинга мутации G143A в

популяциях разных грибных патогенов по анализу ДНК аскоспор [14]. С помощью использованного нами метода ПЦР-ПДРФ выявления митохондриальной мутации G143A развитие резистентности к фунгицидам у возбудителя септориоза оценивается также эффективно. Так, у изолятов белорусской популяции гриба данная мутация была идентифицирована неоднократно (рис. 2В). Причем, изоляты-носители мутации обнаружены на полях разных сельскохозяйственных предприятий.

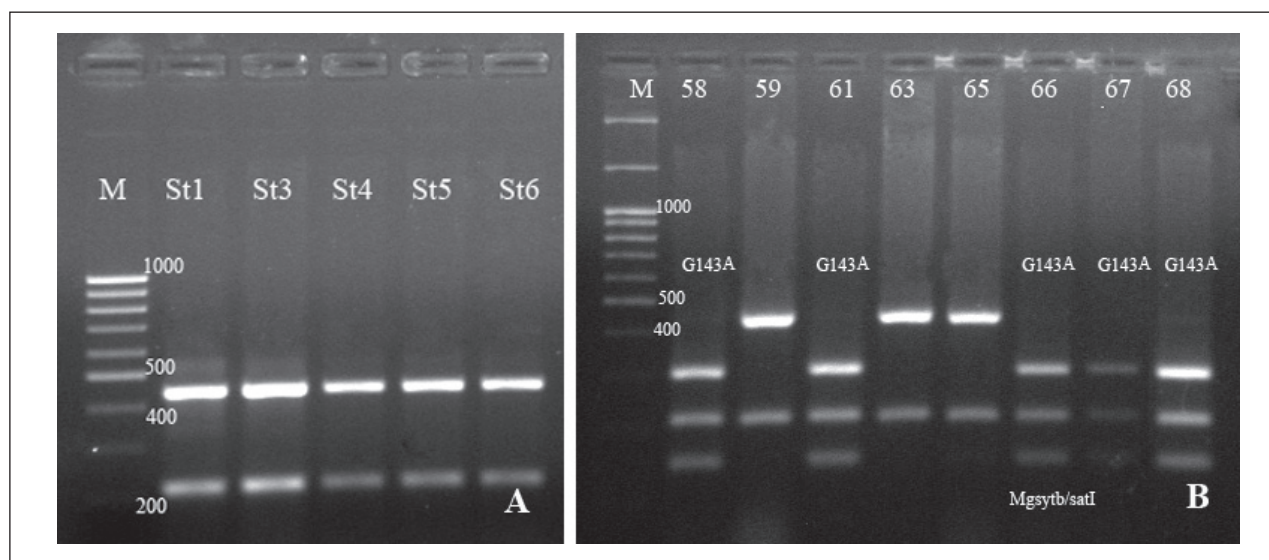


Рис. 2. Пример ПЦР-ПДРФ анализа, проведенного для изолятов *Mycosphaerella graminicola*, показывающий наличие/отсутствие митохондриальной мутации G143A.

А – изоляты, взятые из литовской популяции; В – изоляты, взятые из белорусской популяции.

Мутация резистентности G143A определяется по наличию трех рестрикционных фрагментов ДНК: 298, 210 и 144 п.н. и присутствует у изолятов № 58, 61, 66, 67, 68.

Отсутствие мутации характеризуется наличием двух фрагментов размером 442, 210 п.н. (изоляты № 59, 63, 65).

Развитие резистентности к фунгицидам стало обычным явлением после внедрения и широкого использования односайтовых фунгицидов: метилбензимидазолов (MBCs), азолов (DMIs) и стробилуринов (QoIs). Усовершенствованные методы мониторинга и детекции устойчивости предоставляют новую информацию о том, как популяции патогенов реагируют на отбор фунгицидами. Однако пока нет точного способа предсказать, когда или где устойчивость может появиться. Вместо этого акцент делается на задержке, насколько это возможно, появления устойчивости и управлении проблемой, если она возникает. Чувствительные диагностические анализы, которые определяют основные генетические изменения, ответственные за

устойчивость, могут обеспечить ранний прогноз потенциальных проблем и помогают оценить влияние различных антирезистентных стратегий на развитие устойчивости в полевых условиях. Разработка методов ПЦР-анализа в этом отношении весьма перспективна. Использование ПЦР позволяет не только обнаружить мутацию резистентности, но и определить ее частоту в популяции патогена, что дает точную информацию о появлении и развитии устойчивости к фунгициду гораздо быстрее и более точно, чем это было возможно с использованием биоанализа. Молекулярные методы также являются ценными инструментами для оценки влияния различных технологий защиты растений и методов управления, направленных на недо-

пушение развития резистентности к фунгицидам. Хотя в краткосрочной перспективе подходы, основанные на применении ПЦР-анализа, не улучшат нашу способность предотвращать развитие устойчивости к химическим средствам защиты растений, они должны обеспечивать раннее предупреждение о возникающих

проблемах и давать выигрыш во времени для принятия соответствующего решения. В долгосрочной перспективе понимание молекулярной и генетической основы устойчивости приведет к лучшим и научно-обоснованным подходам к оценке и управлению проблемами в случае их возникновения.

Заключение

Впервые в Беларуси разработана и применена методика идентификации митохондриальной мутации, связанной с развитием устойчивости к стробилуринам у *Mycosphaerella graminicola*, возбудителя септориоза пшеницы, основанная на ПЦР-ПДРФ анализе. Предложены оптимальные условия для выделения и очистки ДНК, позволяющие провести ПЦР-анализ любого изолята гриба. Оптимизированы условия проведения ПЦР-ПДРФ анализа, что дало возможность оценить на наличие мутации G143A

коллекцию изолятов *M. graminicola*, предоставленную РУП «Институт защиты растений НАН Беларуси», и выявить резистентные к фунгициду генотипы фитопатогена. В дальнейшем этот метод может быть применен для мониторинга мутации устойчивости к стробилуринам в популяции возбудителя септориоза листьев пшеницы, что позволит оперативно реагировать на изменение фитопатогенной ситуации в стране и оптимизировать стратегию защиты посевов от болезни.

Список использованных источников

1. Gharbi, M.S. Breeding for resistance to *Septoria tritici* in durum wheat / M.S. Gharbi, M. Deghais, A.F. Ben // Proc. of durum wheat conference. Zaragoza, Spain. – 2000. – P. 397–401.
2. Goodwin, S.B. Back to basics and beyond: increasing the level of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat / S.B. Goodwin // Australasian Plant Pathol. – 2007. – Vol. 36. – P. 532–538.
3. Mapping quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch in spelt wheat / M.R. Simon [et al.] // Eur. J. Plant. Pathol. – 2010. – Vol. 128. – P. 317–324.
4. Zhan, J. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow / J. Zhan, R.E. Pettway, B.A. McDonald // Fungal Genet Biol. – 2003. – Vol. 38. – P. 286–297.
5. Eyal, Z. Integrated control of *Septoria* diseases of wheat / Z. Eyal // Plant Dis. – 1981. – Vol. 65. – P. 763–768.
6. Raman, H. Molecular Breeding for *Septoria tritici* Blotch Resistance in Wheat / H. Raman, A. Milgate // Cereal Research Communications. – 2012. – Vol. 40, № 4. – P. 451–466.
7. Буга, С.Ф. Теоретические и практические основы химической защиты зерновых культур от болезней в Беларуси / С.Ф. Буга. – Несвиж, 2013. – 239 с.
8. Godwin, J.R. Azoxystrobin: Implications of biological mode of action, pharmacokinetics and resistance management for spray programmes against *Septoria* diseases of wheat / J.R. Godwin, D.W. Bartlett, S.P. Heaney // *Septoria on Cereals: a Study of Pathosystems*; J.A. Lucas, P. Bowyer, H.M. Anderson eds. – CABI Publishing, Wallingford, UK. – 1999. – P. 299–315.
9. Jordan, V.W.L. Disease management in less-intensive, integrative wheat systems / V.W.L. Jordan, J.A. Hutcheon // *Septoria on Cereals: A Study of Pathosystems* / J.A. Lucas, P. Bowyer, H.M. Anderson eds. – CABI Publishing, Wallingford, UK. – 1999. – P. 263–272.
10. The strobilurin fungicides / D.W. Bartlett [et al.] // Pest Manag Sci. – 2002. – Vol. 58. – P. 649–662.
11. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis f.sp. tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green / B.A. Fraaije [et al.] // Plant Pathol. – 2002. – Vol. 51. – P. 45–54.
12. Sierotzki, H. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis f. sp. tritici* field isolates / H. Sierotzki, J. Wullschleger, U. Gisi // Pestic Biochem and Phys. – 2000a. – Vol. 68. – P. 107–112.

13. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates / H. Sierotzki [et al.] // Pest Management Science. – 2000b. – Vol. 56. – P. 833–841.
14. Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola* / B.A. Fraaije [et al.] // Phytopathology. – 2005. – Vol. 95. – P. 933–941.
15. Resistance development to QoI inhibitors in populations of *Mycosphaerella graminicola* in the UK / B.A. Fraaije [et al.] // Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV; H.W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell eds. – BCPC, Alton, UK. – 2005a. – P. 63–71.
16. Dynamics of *Mycosphaerella graminicola* populations in response to selection by different fungicides / U. Gisi [et al.] // Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV; H.W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell eds. – BCPC, Alton, UK. – 2005. – P. 73–80.
17. Sensitivity of *Cyp51* genotypes to DMI fungicides in *Mycosphaerella graminicola* / C. Chassot [et al.] // Modern Fungicides and Antifungal Compounds V; H.W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell eds. – DPG Seebsterverlag, Braunschweig, Germany. – 2008. – P. 129–136.
18. Field strategies to manage fungicide resistance in *Mycosphaerella graminicola*, the causal agent of wheat leaf blotch / P. Leroux [et al.] // Modern Fungicides and Antifungal Compounds V; H.W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell eds. – DPG Seebsterverlag, Braunschweig, Germany. – 2008. – P. 143–149.
19. Birch, C.P.D. When can reduced doses and pesticide mixtures delay the build-up of pesticide resistance? A mathematical model / C.P.D. Birch, M.W. Shaw // J. Appl. Ecol. – 1997. – Vol. 34. – P. 1032–1042.
20. Shaw, M.W. Models of the effects of dose heterogeneity and escape on selection pressure for pesticide resistance / M.W. Shaw // Phytopathology. – 2000. – Vol. 90. – P. 333–339.
21. Wiggins, T.E. Mode of action of the new methoxyacrylate antifungal agent ICIA5504 / T.E. Wiggins, B.J. Jager // Biochemical Society Transactions. – 1994. – Vol. 22. – P. 68.
22. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene / Y.S. Kim [et al.] // Phytopathology. – Vol. 2003, № 93. – P. 891–900.
23. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides / U. Gisi [et al.] // Pest. Manag. Sci. – 2002. – Vol. 58. – P. 859–867.
24. Paveley, N.D. Decision support to rationalise wheat fungicide use / N.D. Paveley // Brighton Crop Protection Conference on Pests and Disease. – 1994. – P. 679–686.
25. Determinants of fungicide spray decisions for wheat / N.D. Paveley [et al.] // Pesticide Science. – 1997. – Vol. 49. – P. 379–388.
26. Intraspecific comparison and annotation of two complete mitochondrial genome sequences from the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola* / S.F.F. Torriani [et al.] // Fungal Genet Biol. – 2008a. – Vol. 45. – P. 628–637.
27. Torriani, S.F.F. QoI resistance evolution in European populations of *M. graminicola* / S.F.F. Torriani // Mitochondrial genomes of plant pathogenic fungi. Diss., Eidgenössische Technische Hochschule ETH Zürich. – № 18123. – 2008b. – P. 123–142.
28. Chen, R.S. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola* / R.S. Chen, B.A. McDonald // Genetics. – 1996. – Vol. 142. – P. 1119–1127.
29. McDonald, B.A. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (an amorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field / B.A. McDonald, J.P. Martinez // Phytopathol. – 1990a. – Vol. 80. – P. 1368–1373.
30. McDonald, B.A. Restriction fragment length polymorphisms in *Septoria tritici* occur at a high frequency / B.A. McDonald, J.P. Martinez // Current Genetics. – 1990b. – Vol. 17. – P. 133–138.
31. Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (an amorph *Septoria tritici*) in Germany / F. Schnieder [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2001. – Vol. 107. – P. 285–290.
32. Local adaptation and effect of host genotype on the evolution of pathogens: an experimental test in a plant pathosystem / J. Zhan [et al.] // J. Evol. Biol. – 2002. – Vol. 15. – P. 634–647.

33. Strobilurin fungicides cannot prevent sex and cause preferential mating in the wheat septoria tritici blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* / S.B. Ware [et al.] // Ware, S.B. Aspects of Sexual Reproduction in *Mycosphaerella* Species on Wheat and Barely: Genetic studies on Specificity, Mapping, and Fungicide Resistance / PhD thesis. Wageningen. – 2006. – P. 101–122.
34. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola* / S.F.F. Torriani [et al.] // Pest Manag Sci. – 2009. – Vol. 65. – P. 155–162.
35. Polley, R.W. Surveys of diseases of winter-wheat in England and Wales, 1976–1988 / R.W. Polley, M.R. Thomas // Ann Appl Biol. – 1991. – Vol. 119. – P. 1–20.
36. Delye, C. A mutation in the 14 alpha-demethylase gene of *Uromyces necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor / C. Delye, F. Laigret, M.F. Corio-Costet // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 63. – P. 2966–2970.
37. Wyand, R.A. Sequence variation in the *CYP51* gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides / R.A. Wyand, J.K.M. Brown // Fungal Genet. Biol. – 2005. – Vol. 42. – P. 726–735.

Дата поступления статьи 3 мая 2014 г.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ ЗАПАСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ФОСФОРА В СЕМЕНАХ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

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

²УО «Белорусский государственный технологический университет»

Республика Беларусь, 227006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а

³ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

Введение

Семена льна являются источником ценного растительного масла, кормового белка, микроэлементов и диетической клетчатки. Основным лимитирующий фактор зернофуражного использования семян льна это антинутриенты: цианогенные гликозиды, антагонист витамина В₆ и фитин – смешанная К, Mg, Са-соль миоинзитгексафосфорной (фитиновой) кислоты [1].

Соли фитиновой кислоты (фитаты, или фитин) – основная форма запасаания фосфора в масличных семенах – являются конечным продуктом обмена и используются только при прорастании семян. Из минорных компонентов льняного семени фитин представляет наибольший интерес, так как, во-первых, его содержание в обезжиренном семени выше, чем других антинутриентов и достигает 1,8–3,0% [2], во-вторых, для многих сельскохозяйственных культур уже получены формы, в семенах которых уровень накопления фитиновой кислоты снижен на 50–65% [3].

В растительной клетке фитин является запасным веществом не только фосфора, но и инозитола и микроэлементов, а также участвует в метаболизме нуклеиновых кислот [4] и регуляции эндоцитоза [5]. Кинетика ферментов биосинтеза фитиновой кислоты [6, 7], так же как изменчивость уровня ее накопления в семенах растений [8] хорошо изучены. К факторам, определяющим содержание фитина в семенах, относятся: содержание и доступность фосфора в почве, погодные условия вегетации, генетические и физиологические особенности функционирования систем

фосфатного транспорта, мио-инозитол-киназ и ферментов биосинтеза инозитола [9].

В организме человека и многих животных фитин не метаболизируется [10], его сильные хелатирующие свойства препятствуют усвоению микроэлементов (особенно цинка и железа) и белка в пище. Однако в ряде работ показано, что сильные антиоксидантные свойства фитиновой кислоты благоприятны для профилактики и контроля опухолеобразования, укрепления иммунной системы, предотвращения патологической кальцификации и образования камней в почках, снижения уровня холестерина и тромбоцитарной активности [11].

Таким образом, для человека фитин является антинутриентом с полезными для здоровья свойствами, что определяет два альтернативных направления улучшения пищевых качеств льна: 1) низкофитиновые формы, семена которых легко усваиваются организмами с недостаточностью ферментов-фитаз; 2) сорта с высоким уровнем накопления производных фитиновой кислоты, обуславливающей высокие антиоксидантные и хелатирующие свойства получаемых продуктов.

В связи с этим, целью нашего исследования являлось изучение изменчивости уровня накопления фитина и неорганических фосфатов в семенах льна масличного, факторов, определяющих эту изменчивость, и скрининг коллекции для поиска вероятных сортов-доноров признаков как высокого, так и низкого накопления запасных соединений фосфора.

Материалы и методы

Объект исследований – коллекция 28 сортов и сортообразцов льна масличного: Antares, Mivast, Atalante (Франция); BlueChip (Венгрия); Glenelg

(Австралия); Deep Pink (Нидерланды); Linota, SU-1-10, Omega, (США); К 5827 (Уругвай); Gold Flax, McGregor, Somme, К 6582, К 6570, Flanders

(Канада); Raluca, Sandra (Чехия); Цуан (Польша); К 2398 (Китай); Воронежский, К 5627, К 5621, Небесный (Россия); ЛМ-1, ЛМ-2, (Беларусь).

Для определения неорганического фосфата был использован метод Лоури-Лопеса в модификации Скулачева [12], который характеризуется высокой чувствительностью и позволяет определить от 0,3–6,0 мкг Р в 1 мл раствора.

Оценку уровня фитиновой кислоты в образ-

цах семян льна проводили по методу Латта и Эскин [13], в основе которого лежит обесцвечивание раствора сульфогидрата железа в присутствии мио-инозитол фосфат-ионов.

Статистическую обработку данных проводили в программной среде Statistica 7.0 с использованием модулей: общие линейные модели (GLM); непараметрическая статистика, кластерный анализ [14].

Результаты и обсуждение

Схема опыта для оценки влияния генотипа и условий выращивания на содержание фитина и неорганического фосфора в семенах включала

исследование 26 генотипов льна, выращиваемых на территории ЦБС НАН Беларуси в 2005–2009 гг. Результаты анализа представлены табл. 1.

Таблица 1

Содержание фитина и фосфора в семенах льна культурного

№	Сорт	Фосфор, мг/г семян						Фитин, мг/г семян					
		2005	2006	2007	2008	2009	Среднее	2005	2006	2007	2008	2009	Среднее
1	Antares	2,51	2,19	2,05	2,18	1,89	2,16	34,53	35,88	34,96	29,05	31,33	33,15
2	Atalante	3,21	2,41	2,23	2,70	2,84	2,68	36,14	35,88	36,38	29,63	31,75	33,96
3	Blue Chip	2,54	2,05	2,42	2,47	2,44	2,38	39,47	38,73	35,90	30,40	32,49	35,40
4	Glenelg.	2,55	1,87	1,86	2,17	1,87	2,06	35,33	36,66	35,71	28,07	33,21	33,80
5	Gold Flax	1,93	1,24	1,51	1,87	1,50	1,61	31,23	29,22	31,82	24,63	31,77	29,73
6	Deep Pink	2,57	1,99	2,19	2,24	2,10	2,22	34,65	35,98	35,31	27,59	33,93	33,49
7	Linota	2,67	2,05	2,08	2,33	2,00	2,23	34,97	33,72	35,17	28,21	32,49	32,91
8	McGregor	2,64	2,32	2,01	2,44	1,87	2,25	35,54	34,29	34,96	27,47	32,34	32,92
9	Omega	2,8	2,06	2,04	2,32	1,75	2,19	35,74	35,02	35,30	27,70	33,50	33,45
10	Raluca	2,92	2,58	1,77	2,56	2,50	2,46	36,53	37,51	35,71	31,30	34,65	35,14
11	Sandra	1,99	1,97	0,90	1,97	1,61	1,69	36,00	35,07	33,29	28,08	31,62	32,81
12	Somme	2,3	2,20	1,05	2,13	1,76	1,89	36,93	36,73	33,70	31,35	33,64	34,47
13	Воронежский	2,2	1,60	0,96	2,01	1,62	1,68	35,65	33,01	32,35	27,58	32,10	32,14
14	К-5627	2,63	1,95	1,78	2,35	1,87	2,12	35,73	35,87	33,97	29,22	32,06	33,37
15	К-5621	2,53	1,50	0,99	1,87	1,82	1,74	35,59	33,53	33,03	30,12	34,37	33,33
16	К-5827	2,08	1,95	1,38	1,47	1,32	1,64	35,69	34,05	32,89	28,22	29,31	32,03
17	ЛМ-1	2,32	1,76	1,78	2,54	1,74	2,03	35,98	36,91	31,82	28,42	33,50	33,32
18	ЛМ-2	2,48	2,11	1,52	2,29	2,08	2,10	36,78	38,99	36,26	31,67	35,09	35,76
19	Небесный	2,62	1,51	1,44	1,97	1,40	1,79	33,77	37,66	32,89	28,52	31,77	32,92
20	SU-1-10	2,79	1,94	1,83	2,56	1,57	2,14	33,05	32,99	30,74	27,73	28,88	30,68
21	Цуан	1,87	1,57	1,70	1,94	1,39	1,69	32,88	35,84	31,55	28,15	30,27	31,74
22	К-2398	2,59	2,19	2,22	1,82	1,55	2,08	34,04	36,40	32,89	29,30	33,21	33,17
23	Л-6582	2,61	1,83	1,80	1,98	1,73	1,99	36,94	36,62	34,11	30,56	33,79	34,41
24	К-6570	2,15	1,76	1,79	2,00	1,24	1,79	34,77	35,33	32,89	28,70	30,03	32,34
25	Flanders	2,8	1,91	1,94	2,25	1,55	2,09	34,37	33,77	31,15	27,46	32,49	31,85
26	Mivast	2,44	2,01	2,01	1,69	1,60	1,95	33,09	33,51	31,96	28,49	31,62	31,73
Среднее		2,49	1,94	1,76	2,16	1,80	2,03	35,21	35,35	33,62	28,72	32,37	33,08
НСР _{0,01}		0,13	0,21	0,25	0,22	0,24		1,06	1,75	2,98	1,47	1,44	
НСР _{0,05}		0,17	0,27	0,32	0,28	0,32		1,39	2,30	3,91	1,93	1,89	

В семенах льна депонируется от 1,61 мг/г (сорт Gold Flax) до 2,68 мг/г (Atalante) неорганических фосфатов, и 29,73–35,76 мг/г (Gold Flax и ЛМ-2 соответственно) фитина. Результаты, полученные по фитиновой кислоте, выше указанного в литературе диапазона 22,8–32,5 мг/г [15]. Исходя из сравнения коэффициентов варьирования, межсортная изменчивость накопления неорганических фосфатов в семенах льна выше, чем изменчивость содержания фитиновой кислоты (13,39% для неорганических фосфатов и 4,15% для фитина). Достоверно различается содержание фитина и фосфатов в семенах урожаев разных лет (2005–2009 гг.), исключение составляет количество фитина в семенах, полученных в 2005 и 2006 гг. Так, максимальное количество фосфатов в семенах льна запасалось в условиях 2005 г., минимальное в 2007 г., для фитина это 2006 и 2008 гг. соответственно.

Проведен анализ связи уровня накопления фитина и неорганических фосфатов и погодных условий (среднемесячная температура окружающей среды, °C; количество выпавших осадков, мм [16]) сезона выращивания. Повышенное накопление фитина (более 35,0 мг/г) и фосфатов в семенах льна урожаев 2005 и 2006 гг. мы связываем с увеличением подвижности почвенного фосфора в августе (рис. 1), обусловленного высокой интенсивностью осадков (более 188,0 мм) и снижением испарения (среднемесячная температура воздуха 17,7 °C). Также отмечено, что рост содержания фитина в семенах ассоциирован с увеличением количества июньских осадков

и температуры воздуха в июле. Можно предположить, что в данном случае интенсивное накопление вегетативной массы сопровождается депонированием избытка фосфатов и глюкозы в виде фитиновой кислоты.

Максимальные уровни фосфатов отмечены в семенах урожаев 2005 и 2008 гг. Погодная особенность этих лет – низкая среднемесячная температура июня (15,5 и 16,4 °C, 2005 и 2008 гг. соответственно) и засуха в июне-июле (82,2 мм и 46,6 мм соответственно в июне и июле 2005 г.; 40,0 и 90,0 мм в июне и июле 2008 г.), совпадающая с периодами роста, цветения и первых этапов формирования семян льна масличного. Статистический анализ показал, что содержание неорганических фосфатов в семени льна достоверно коррелирует с количеством осадков, выпадающих в мае ($r = 0,9$), вероятно ранние этапы онтогенеза важны для поддержания оптимального уровня фосфорного обмена.

Известно, что количество фосфора, необходимое для поддержания нормального протекания физиологических процессов, поступает в семя еще на стадии деления клеток (для большинства культур это первые 14 дней после опыления). В дальнейшем все поступающие в семя фосфаты направляются на синтез фитиновой кислоты [17]. Для льна масличного выявлена прямая зависимость между накоплением неорганических фосфатов и фитина в семени ($r = 0,5$), что является следствием увеличения скорости обмена фосфатов и их иммобилизацией в соединении с мио-инозитолом и минералами.

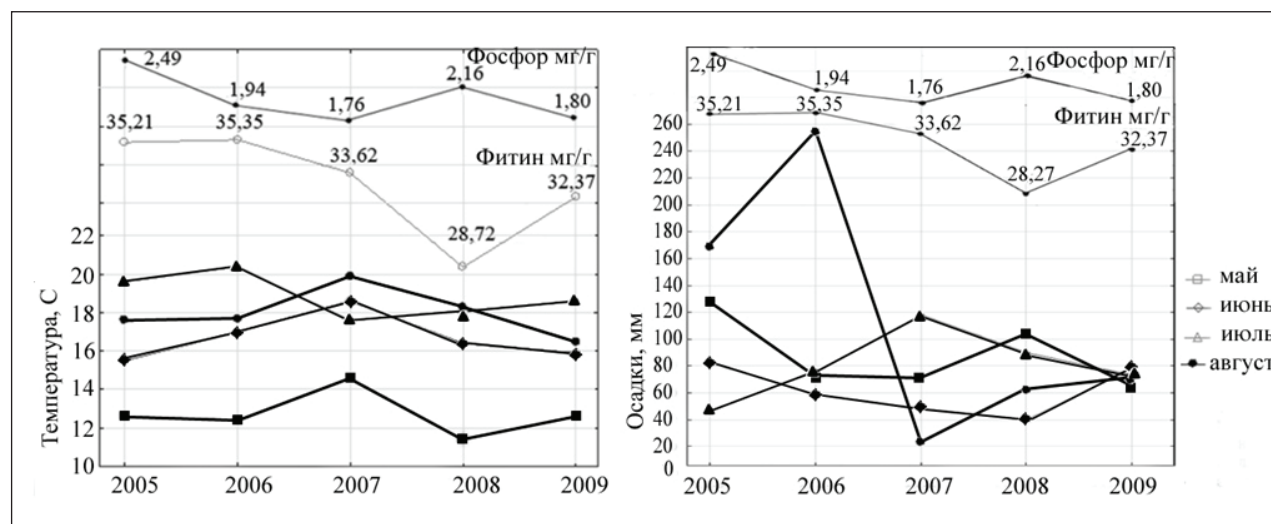


Рис. 1. Сопоставление погодных условий полевых сезонов 2005–2009 гг. и среднего содержания фитиновой кислоты и неорганических фосфатов в семенах льна масличного

Для оценки влияния генетических и средовых факторов на результирующее содержание фитина и неорганических фосфатов в семенах льна был проведен двухфакторный дисперсионный анализ (табл. 2). В качестве генетического фактора выступали различия между сортами, средового – различия между сезонами выращивания льна.

Таблица 2

Двухфакторный дисперсионный анализ содержания фитина и неорганических фосфатов в семенах льна масличного

	Фитин					Фосфор				
	SS	DF	MS	F	%	SS	DF	MS	F	%
Генотип	705,0	24	29,4	120,0*	17,9	25,3	24	1,1	175,2*	29,3
Среда	2267,8	4	567,0	2307,0*	69,3	27,3	4	6,8	1136,0*	38,2
Генотип×среда	368,1	96	3,8	16,0*	11,0	21,1	96	0,2	36,6*	30,0
Ошибка	61,4	250	0,2		1,8	1,5	250	0,0		2,5

Примечание. SS – сумма квадратов; DF – степени свободы; MS – средние квадраты

* – достоверно при $p \leq 0,05$

Влияние факторов «генотип», «сорт» и их взаимодействия на содержание фитина и фосфора в семенах статистически значимо, однако их вклад в изменчивость исследуемых признаков различен. Влияние среды и генотипа на накопление неорганических фосфатов составляет соответственно 38,2% и 29,3%, их взаимодействия – 30,0%. Преобладающее влияние на содержание фитина в семенах оказывают условия выращивания (69,3%), уровень воздействия генотипа (17,9%) и взаимодействия факторов (11,0%) ниже. Что отличается от данных B. Dave Oomah et al. (1998), в работе которых при выращивании льна в условиях канадских прерий содержание фитиновой кислоты в семенах льна главным образом определяется генотипом растения (37,0%) и взаимодействием генотип-среда (36,0%) [15].

Более высокий вклад средовых факторов в изменчивость уровня фитина может быть обусловлен вторичной метаболической ролью фитиновой кислоты по отношению к неорганическим фосфатам. Вероятно, в условиях недостатка фосфора в почвах генетические различия сортов по уровню накопления фитина должны быть выражены сильнее, как описано в работе Bhatta and Cherdkiatgumchai [2].

Условия выращивания – температура, количество осадков, микрофлора почвы влияют на накопление фосфатов и фитина в семенах. Однако средовые эффекты сглаживаются эффективными механизмами контроля фосфор-

ного обмена, например, кислые фосфатазы регулируют поступление фосфатов, продукты генов *miR399*, *IPS/At4* и *UBC24* – флоэмный транспорт фосфатов, *Ins(3)P1* синтаза и *MI* киназа – синтез фитиновой кислоты [18]. В свою очередь, уровень экспрессии ферментов и синтеза микро-РНК определяется взаимодействием генотипа и условий выращивания.

Для множественных сравнений исследуемых сортов по содержанию фитина и неорганических фосфатов в семенах был использован апостериорный анализ t-Дункана. Результаты сравнения средних по критерию наименьшей значимой разницы и выделения групп существенно неразличающихся между собой сортов представлены на рис. 2.

По содержанию фитиновой кислоты тест разбил коллекцию на 11 групп, 7 из которых характеризуются значительным перекрытием сортового состава. В группе с наиболее низким содержанием фитиновой кислоты только один генотип льна – низколиноленовый мутант Gold Flax. В группе со статистически наиболее высоким содержанием фитина в семенах два сорта – крупносеменные Raluca и Blue Chip. Разбиение коллекции по уровню неорганических фосфатов более дисперсно – 9 из 15 групп содержат 1–3 сорта. В группе с минимальным содержанием фосфатов два генотипа – Gold Flax и K 5827, в противоположной группе 1 сорт – Atalante.

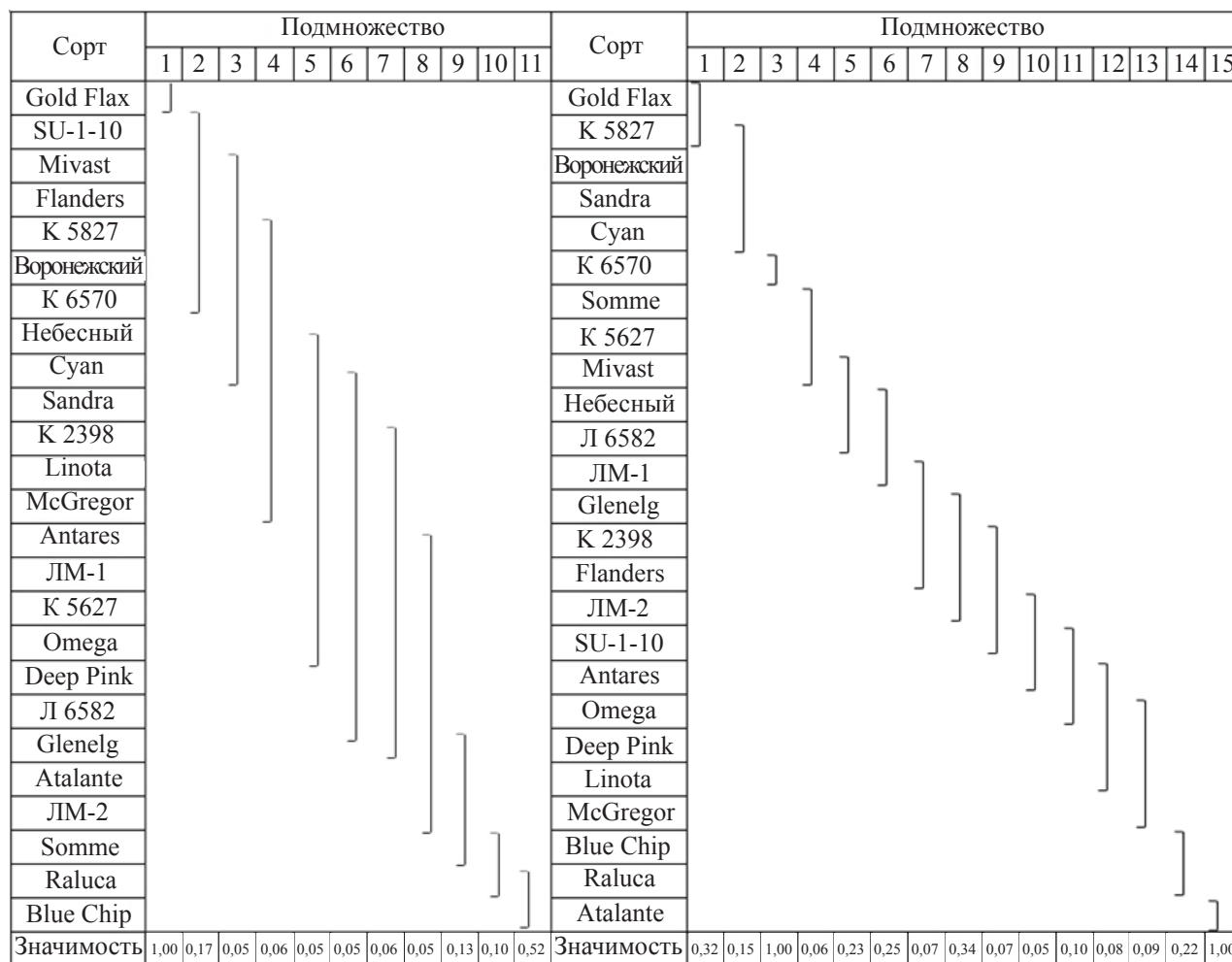


Рис. 2. Результаты множественных сравнений средних значений накопления фитина и фосфора в семенах 26 сортов льна (теста t-Дункана). Границы существенно неразличающихся (при $p \leq 0,05$) групп сортов выделены прямоугольными скобками

Донорские качества исследуемых генотипов оценивали с использованием коэффициента повторяемости (КП) – популяционного показателя, который приблизительно совпадает с верхней границей коэффициента наследуемости [19]. Повторяемость (устойчивость) индивидуальных различий по изучаемому признаку определяют при многократном измерении признака у одних и тех же генотипов при выращивании в разных условиях. Для расчета КП используют дисперсионный или корреляционный анализ, при последнем между двумя измерениями вычисляют коэффициент корреляции.

Для содержания фитина средний за пять лет КП составил 0,58, для уровня фосфора – 0,55, что соответствует средней степени наследуемости признаков. Исходя из значений КП, можно предположить, что изменения средовых факторов по сезонам выращивания сказываются на

общем уровне накопления фосфорсодержащих соединений, однако межсортовые различия сохраняются. Сорта, характеризующиеся фенотипическим превосходством по накоплению фитина или неорганических фосфатов, сохраняли свое превосходство на протяжении всего исследованного периода; то же самое отмечено для сортов с низким содержанием исследуемых соединений.

Для выявления сортов, характеризующихся благоприятным сочетанием признаков высокого/низкого содержания фитиновой кислоты и неорганических фосфатов, исследуемая коллекция была классифицирована с использованием кластерного анализа по методу k-средних без предварительной стандартизации данных.

Исходя из предварительных данных иерархического кластерного анализа, сделано предположение о наличии в исследуемой коллекции сортов четырех естественных массивов

данных. Вычисление центров и состава кластеров в программе Statistica 7.0 потребовало два цикла итерации данных. Сортосовый состав,

средние значения признаков и F критерия Фишера, а также статистическая значимость выявленных различий представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты k-кластерного анализа 26 сортов льна масличного по содержанию фитина и неорганических фосфатов в семенах

k-кластер	Фосфор, мг/г					Фитин, мг/г				
	2005	2006	2007	2008	2009	2005	2006	2007	2008	2009
1	2,57	2,15	1,71	2,29	2,10	37,33	37,72	35,14	31,06	33,93
2	2,59	1,98	1,82	2,22	1,87	35,23	35,60	34,28	28,57	32,70
3	1,93	1,24	1,51	1,87	1,50	31,23	29,22	31,82	24,63	31,77
4	2,33	1,82	1,66	1,99	1,47	34,21	34,07	31,93	28,05	30,67
F	2,53	4,34*	0,31	1,73	4,79*	15,10*	18,70*	9,09*	32,24*	9,14*

Примечание. Состав кластеров: 1 – Blue Chip, Raluca, Somme, ЛМ-2, Л-6582; 2 – Antares, Atalante, Glenelg, Deep Pink, Linota, McGregor, Omega, Sandra; К-5627, К-5621, ЛМ-1, Небесный, К-2398; 3 – Gold Flax; 4 – Воронежский, К-5827, SU-1-10, Cyan, К-6570, Flanders, Mivast

* – достоверно при $p \leq 0,05$

В первой группе объединены крупносемянные, раннеспелые в условиях Беларуси сорта (вегетационный период 88–92 дня). Семена сортов этого кластера (Blue Chip, Raluca, Somme, ЛМ-2, Л-6582) накапливают высокие уровни фитина и фосфатов и могут быть рекомендованы для производства фитина в фармацевтических и технических целях.

Основным отличием сортов, формирующих второй кластер (Antares, Atalante, Glenelg, Deep Pink, Linota, McGregor, Omega, Sandra, К-5627, ЛМ-1, Небесный, К-2398, К-5621), является более низкое (на 2–3 мг/г), по сравнению с кластером 1, содержание фитина в семенах,

в то время как по уровню фосфатов кластеры статистически не различаются. В третьей группе только один сорт – Gold Flax – низколиноленовый мутант льна с самым низким накоплением фосфорсодержащих соединений в семенах во все пять лет исследования. В четвертом кластере объединены сорта представляющие интерес для производства кормов и пищевых продуктов (Воронежский, К-5827, SU-1-10, Cyan, К-6570, Flanders, Mivast). Таким образом, метод k-кластеров позволил выделить группы генотипов, достоверно различающиеся по уровню накопления запасных соединений фосфора.

Заключение

Анализ межсортовой и межсезонной дисперсии признаков накопления фитиновой кислоты и фосфатов в семени льна показал, что изучаемый набор сортов характеризуется высокой степенью экологической пластичности, сходным образом реагирует на изменяющиеся условия внешней среды и обладает достаточной генетической гетерогенностью для поиска доноров высокого/низкого уровня фитина и фосфатов в семенах.

В зависимости от генотипа и условий выращивания в семенах льна накапливается 1,6–2,7 мг/г неорганических фосфатов и 29,7–35,8 мг/г фитиновой кислоты. Между накоплением неорганических фосфатов и фитина

в семенах льна существует прямая корреляционная зависимость ($r = 0,5$), что обусловлено общими закономерностями фосфорного обмена развивающегося зародыша. Если уровни влияния средовых и генетических факторов на накопление фосфатов в семени льна близки (38,2% и 29,3%, соответственно), то содержание фитиновой кислоты в большей мере определяется условиями выращивания (69,3% – эффект среды и 17,9% – эффект генотипа).

Исходя из коэффициента повторяемости, для признаков содержания фитина и неорганических фосфатов показана средняя степень наследуемости, что позволяет говорить о возможности от-

бора на повышение/понижение их содержания в семенах льна. Кластерный анализ позволил выделить группы сортов – перспективных доноров благоприятного сочетания исследуемых признаков. Показано, что генофонд исследованной коллекции льна масличного содержит перспективные сорта-доноры признаков как высокого, так и низкого уровня накопления фитина и неорганических фосфатов. Семена сортов первого кластера содержат максимально высокие дозы

фитиновой кислоты, далее в порядке убывания располагаются второй, третий и четвертый кластеры. В разные годы по содержанию фосфатов лидируют первый и второй кластеры, вероятно, у составляющих их сортов при общем высоком уровне накопления неорганических фосфатов, механизмы контроля фосфорного обмена различаются. В четвертом кластере объединены сорта, представляющие интерес в качестве доноров низкого содержания фитина в семенах.

Список использованных источников

1. Muir, A.D. Flaxseed constituents and human health / A.D. Muir, N.D. Westcott // *Flax: The genus *Linum**. – NY: CRC Press, 2003. – P. 243–252.
2. Bhatti, R.S. Compositional analysis of laboratory-prepared and commercial samples of linseed meal and of hull isolated from flax / R.S. Bhatti, P. Cherdkiatgumchai // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1990. – Vol. 57. – P. 79–84.
3. Raboy, V. Progress in breeding low phytate crops / V. Raboy // *J. Nutr.* – 2002. – Vol. 32, № 3. – P. 503S–507S.
4. Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair / L.A. Hanakahi [et al.]. // *Cell* – 2000. – Vol. 102, № 6. – P. 721–729.
5. Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking / A. Saiardi [et al.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – Vol. 99, № 22. – P. 14 206–14 211.
6. Stevenson-Paulik, J. Molecular and biochemical characterization of two plant inositol polyphosphate 6-/3-/5-kinases / J. Stevenson-Paulik, A.R. Odom, J.D. York // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – P. 42 711–42 718.
7. Characterisation of structural genes involved in phytic acid biosynthesis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) / M. Fileppi [et al.]. // *Molecular Breeding*. – 2010. – Vol. 25, № 3. – P. 453–470.
8. Толочко, В.В. Возможные функции миоинозита в растениях / В.В. Толочко, К.З. Гамбург // *Усп. совр. биол.* – 1978. – Т. 85, № 1. – С. 50–62.
9. Loewus, F. Biosynthesis of phytate in food grains and seeds / F. Loewus // *Food phytates* / N.R. Reddy, S.K. Sathe (Eds.). – Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2002. – P. 53–61.
10. Zhou, J.R. Phytic acid in health and disease / J.R. Zhou, J.W. Erdman // *Critical Review in Food Science and Nutrition*. – 1995. – Vol. 35. – P. 459–508.
11. Sandberg, A.S. Bioavailability of minerals in legumes / A.S. Sandberg // *British Journal of Nutrition*. – 2002. – Vol. 88, № 3. – P. S281–S285.
12. Скулачев, В.П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи / В.П. Скулачев – М.: Наука, 1962. – 153 с.
13. Latta, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination / M. Latta, M. Eskin // *J. Agric. Food Chem.* – 1980. – Vol. 28, № 6. – P. 1315–1315.
14. Боровиков, В.П. Популярное введение в программу Statistica / В.П. Боровиков, М.: КомпьютерПресс, 2000. – 269 с.
15. Oomah, B.D. Phytic acid content of flaxseed as influenced by cultivar, growing season, and location / B.D. Oomah, E.O. Kenaschuk, G. Mazza // *J. Agric. Food Chem.* – 1996. – Vol. 44. – P. 2663–2666.
16. Архив погоды. Минск [Электронный ресурс] / Республиканский гидрометеоцентр. – Режим доступа: <http://pogoda.by/315/arch.php>. – Дата доступа 15.01.2014.
17. Raboy, V. Genetic improvement of cereals with low phytic acid content / V. Raboy // *Impacts of agriculture on human health and nutrition*. – 2009. – Vol. II – P. 97–117.
18. Doern, P. Phosphate starvation signaling: a three some controls systemic Pi homeostasis / P. Doern // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2008. – Vol. 11. – P. 1–5.
19. Дунин, И.М. Термины и определения, используемые в селекции, генетике и воспроизводстве сельскохозяйственных животных / И.М. Дунин. – М.: ВНИИплем, 1996. – 306 с.

Дата поступления статьи 12 мая 2014 г.

ОСТАТОЧНЫЙ ЭФФЕКТ ПРЕОДОЛЕННЫХ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ К БИОТРОФНЫМ ГРИБНЫМ ПАТОГЕНАМ (обзорная статья)

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Существует традиционное мнение, что главные *R*-гены контролируют полную расоспецифическую устойчивость, а QRLs обуславливают частичную нерасоспецифическую резистентность. Однако это не совсем так. Существуют многочисленные примеры *R*-генов, которые обуславливают неполную устойчивость, в том числе некоторые из них были клонированы и идентифицированы как *NBS-LRR*-гены. Таким образом, качественная и количественная устойчивость к болезням может быть только двумя концами континуума (множества) с *R*-генами, имеющими тенденцию находиться ближе к одному концу спектра и с QRLs – к другому [1].

Отбор благоприятствует *R*-генам с сильными эффектами, однако эволюция патогена раз-

рушает их эффективность, превращая *R*-гены в QRLs. С этой точки зрения фенотипическая вариация и частичная устойчивость могут быть объяснены взаимодействием «малый ген патогена – на – малый ген растения-хозяина», где гены вирулентности с малыми эффектами соответствуют малым генам устойчивости (QRLs), что предполагалось ранее [2, 3], и подтверждаются сорт × изолят-взаимодействиями и расоспецифичностью QRLs [4]. В настоящей статье представлен обзор научной литературы, свидетельствующей о возможности повышения уровня полигенной устойчивости мягкой пшеницы за счет остаточных эффектов преодоленных главных расоспецифических генов устойчивости к мучнистой росе, бурой и стеблевой ржавчине.

Преодоленные гены расоспецифической устойчивости и их вклад в полигенную устойчивость

Некоторые исследователи считают, что частичная (полигенная) устойчивость может быть обусловлена аккумуляцией главных генов расоспецифической устойчивости, которые преодолены [2, 5–10]. Таким образом, полигены представляют собой архаичные главные гены, которые потеряли свою эффективность в результате эволюции вирулентности патогена, но имеют остаточный эффект на устойчивость [13]. Такие главные гены стали неэффективными в качественном смысле, но контролируют количественные признаки резистентности. Было обнаружено, что когда раса патогена преодолевает главный ген устойчивости, пораженность растения болезнью в присутствии преодоленного *R*-гена может быть меньше в сравнении с ее уровнем в отсутствии такого потерявшего эффективность

главного гена. Так, например, в некоторых статьях указывалось, что отдельные *Pm*-гены, преодоленные возбудителем мучнистой росы, вносят вклад в частичную устойчивость к этой болезни [10, 14–17].

Nass с соавт. обнаружили остаточный эффект на устойчивость генов *Pm3c*, *Pm4*, *PmMA* (Michigan Amber) при инокуляции изогенных линий сорта мягкой озимой пшеницы Chancellor изолятом № 144 возбудителя мучнистой росы. У этих линий среднее число колоний на единицу листовой площади и спорулирующая способность изолята были меньше, чем на сорте Chancellor [8, 9]. Однако Anderson предположил, что изогенные линии сорта Chancellor могут быть неоднородны по генетическому фону, и наблюдаемые эффекты обусловлены генетическим фоном, а не преодоленными

генами [18]. В пользу такого предположения свидетельствуют данные, что на рекуррентном сорте Chancellor формировались вторичные колонии гриба, которые не наблюдались на близко изогенных линиях. Впоследствии другие исследователи обнаружили, что близко изогенная линия пшеницы CI 14118 с *Pm2* от сорта Ulka не является такой же, как CI 14119, где ген *Pm2* привнесен от CI 12632 [10]. Оказалось, что эти линии имели различный генетический фон. Согласно исследованиям Nass с соавт. гены *Pm2*, *pm5* не проявляли остаточных эффектов на устойчивость [8, 9].

Chantret с соавт. не обнаружили остаточного эффекта гена *Pm4b* как при оценке устойчивости яровизированных проростков, так и взрослых растений [19]. Однако в отличие от гена *Pm4b* ген *PmMIRE* имел значительный остаточный эффект на возрастную устойчивость линии пшеницы RE714 [19]. При этом оба этих гена не обнаруживали остаточного действия на устойчивость проростков. Таким образом, остаточный эффект преодоленного гена может проявляться только на определенной стадии развития растений. Martin с соавт. выявили специфичность взаимодействия изогенной линии сорта Chancellor с геном *Pm4* и изолятов возбудителя мучнистой росы [14]. Так, при инокуляции двумя вирулентными изолятами гриба развивалось меньшее число повреждений на изогенной линии, чем на сорте Chancellor. То есть ген *Pm4* проявлял остаточный эффект на устойчивость. Однако при заражении третьим изолятом различий по этому признаку между изогенной линией и рекуррентным сортом не отмечалось, только развитие гриба на линии с геном *Pm4* начиналось позже на 2 часа. Это показывает, что остаточный эффект потерявших эффективность главных генов устойчивости может преодолеваться при появлении и накоплении в результате отбора более вирулентных (или агрессивных) изолятов. Такой отбор может происходить быстро из-за высокой частоты появления новых мутаций вирулентности у *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Marchal. – около 2000 мутаций на локус в сутки на 1 га площади посева пшеницы [20].

Royer с соавт. при оценке трех признаков полигенной устойчивости у шести близко изогенных линий сорта Chancellor к девяти

совместимым изолятам возбудителя мучнистой росы обнаружили значительные хозяин – изолят-взаимодействия [10]. Это свидетельствовало о том, что каждый преодоленный ген проявлял остаточный эффект на устойчивость только к некоторым изолятам патогена. Данное явление указывает на вероятность разрушения со временем количественной устойчивости, контролируемой преодоленными генами. Кроме того, было обнаружено, что некоторые почти изогенные линии с одиночными генами *Pm* были более восприимчивы, чем рекуррентный сорт Chancellor. Таким образом, среди использованных изолятов были и такие, которые преодолевали остаточный эффект отдельных потерявших эффективность главных генов резистентности вплоть до отрицательных значений.

Исследования остаточных эффектов на устойчивость были проведены и в отношении генов резистентности мягкой пшеницы к бурой ржавчине. Так, Modavi с соавт. определяли остаточные эффекты генов *Lr1*, *Lr2c*, *Lr3a* на двух генетических фонах – сортах Thatcher и Wichita [11]. Оценивали число спор на 1 см² листовой поверхности первого листа проростков и инфекционный тип. Близко изогенные линии мягкой пшеницы инокулировали 8 изолятами возбудителя бурой ржавчины. Остаточный эффект на устойчивость, выражавшийся в снижении споропродукции, был обнаружен только для гена *Lr2c* при инокуляции лишь некоторыми вирулентными изолятами гриба. Преодоленные гены *Lr1* и *Lr3a* не влияли на уровень полигенной устойчивости.

Одинцова и Михайлова изучили остаточный эффект неэффективных (преодоленных) генов резистентности мягкой пшеницы к бурой ржавчине [21]. В полевых условиях на взрослых растениях изогенных линий сорта Thatcher оценивали показатели: площадь под кривой нарастания болезни, число пустул на 1 см² листовой поверхности, число спор в пустуле. Наилучший повышающий эффект на устойчивость оказывали преодоленные гены *Lr17*, *Lr18*, *Lr21*; снижающий – *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr3b*, *Lr3bq*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr30*, при этом гены *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr15*, *Lr16* более сильно повышали восприимчивость в сравнении с сортом Thatcher, то есть грибок развивался на генотипах с геном устойчивости лучше, чем без

гена. Авторы считают, что эти гены влияли на эволюцию патогена, так как они имеются у многих сортов, длительно выращивавшихся в странах бывшего СССР. Таким образом, ген устойчивости может становиться геном восприимчивости.

Ряд работ посвящен изучению эффектов преодоленных генов устойчивости пшеницы к стеблевой ржавчине. Так, Luig считал, что полевая устойчивость пшеницы к стеблевой ржавчине обусловлена остаточными эффектами генов резистентности, утратившими эффективность [2]. Brodny с соавт. исследовали остаточный эффект генов *Sr6*, *Sr8*, *Sr9a* и их всевозможных парных комбинаций на устойчивость линий сорта Chinese Spring, используя только один изолят патогена [22]. На семи линиях, имеющих 1–2 гена, пустулы и споруляция гриба были меньше, чем на Chinese Spring. Было установлено повышение устойчивости линий с двумя генами в сравнении с линиями, имеющими один *Sr*-ген. По размеру пустул линия с геном *Sr8* была более устойчива, чем с *Sr6* или *Sr9a*. Таким образом, ген *Sr8* имел больший остаточный эффект на резистентность. Однако в дигенных комбинациях этот ген не проявлялся.

Nelson выдвинул предположение, что уровень количественной устойчивости можно повысить путем комбинирования ряда преодоленных расоспецифических генов резистентности [23, 24]. Был изучен эффект пирамидирования преодоленных генов устойчивости пшеницы к мучнистой росе [25]. Оказалось, что на линиях с двумя генами формировалось

значительно меньше повреждений, и спорулирующая способность гриба была ниже в сравнении с линиями, имеющими по одному из этих генов. Каждый ген индивидуально также проявлял остаточный эффект. Четырехгенные линии были более устойчивы, чем двугенные. Sharma с соавт. оценили три основных признака устойчивости (латентный период, число колоний гриба на единицу площади листа, число спор на колонию) при заражении пшеницы изолятом возбудителя мучнистой росы [26]. Оказалось, что гены *Pm3a*, *Pm3*, *Pm3c*, *Pm8* и *PmMA* снижают 2–3 показателя в сравнении с восприимчивым сортом Agra Local. Все пять *Pm*-генов в различных сочетаниях друг с другом увеличивали латентный период в сравнении с сортом Agra Local и линиями, имеющими по одному гену. Комбинации *Pm3c+8*, *Pm3c+PmMA*, *Pm8+PmMA* обуславливали меньшее число спор на колонию. На генетическом фоне сорта Thatcher было обнаружено увеличение устойчивости проростков к бурой ржавчине за счет комбинации преодоленных генов *Lr30+Lr3ka* [27]. Однако на генетическом фоне сорта Neeraw эффект на устойчивость комплекса генов *Lr30+Lr11* отсутствовал [27]. Следовательно, действие преодоленных генов на устойчивость может определяться генетическим фоном сорта. Pederson, рассматривая вопрос о пирамидировании в одном сорте расоспецифических генов с остаточными эффектами на устойчивость, предполагал возможность адаптации патогена к комбинациям таких генов в результате появления суперрасы и преодоления остаточного эффекта [28].

Гены количественной устойчивости и их ассоциация с преодоленными главными генами

Эволюция патогенов, разрушая эффективность *R*-генов, превращает их в QRLs [1], которые являются слабыми формами главных генов устойчивости [29]. Многие QRLs, как было показано, кодируют *NBS-LRR*-гены устойчивости и являются расоспецифическими. Расоспецифические QRLs были выявлены в ряде фитопатосистем и проявляли эффективность только против некоторой доли рас возбудителя болезни. Кроме того, некоторые QRLs одного из родителей могут обуславливать частичную устойчивость к одной расе, а другого родителя – к другой расе [30]. Таким

образом, в определенных случаях количественная устойчивость является более слабой формой расоспецифической устойчивости, опосредованной преодоленными *R*-генами, что и предполагалось ранее [31]. Имеется несколько убедительных примеров, что на аллельные варианты *R*-генов приходится некоторая доля количественной устойчивости у растений. Совместная локализация QRLs и *R*-генов была отмечена у риса [32], кукурузы [33] и картофеля [34]. У риса как *R*-гены, так и аналоги *R*-генов (RGAs) были ассоциированы с QRLs [35].

Малые QTLs были картированы в районах хромосом 1A, 2A и 5B, где локализованы гены устойчивости *Pm3*, *Pm4* и *Pm16* соответственно [36, 37]. О детекции QTL возрастной устойчивости мягкой пшеницы к мучнистой росе в локусе *Pm3* сообщали и другие исследователи [38–40]. Так, например, в этом локусе у японского сорта пшеницы Fukuho-Komugi (Norin 124) был картирован QTL, который происходит от носителя аллеля *Pm3a* сорта Norin 29, поэтому предположили, что в возрастную устойчивость к мучнистой росе вносит вклад остаточный эффект данного аллеля [39]. Недавно Mohler с соавт. показали, что *Pm3e* обуславливал устойчивость к мучнистой росе у немецкого сорта озимой пшеницы Cortez как на ювенильной, так и взрослой стадиях развития растений [40]. Аллель *Pm3g* неэффективен, но может иметь остаточный эффект на устойчивость взрослого растения так же, как и ген специфической устойчивости *MIRE* [41]. В дальнейших исследованиях изучение QTLs возрастной устойчивости к природным популяциям возбудителя мучнистой росы показало отсутствие остаточного эффекта гена *Pm3g*, который имеет французский полукарликовый сорт Courtot, как при оценке яровизированных проростков, так и взрослых растений рекомбинантных инбредных линий, полученных с участием этого сорта и устойчивой линии RE9001 [38]. Однако локализация двух QTLs возрастной устойчивости линии RE714 совпадала с расположением расоспецифических генов *Pm4b* и *MIRE*, которые и обуславливали остаточный эффект на резистентность [16]. В другом исследовании выявленный у сорта Forgo большой QTL возрастной устойчивости к мучнистой росе был связан с остаточным

эффектом неизвестного аллеля гена *pm5* [42]. У сорта Saar аллель *pm5a* проявлял незначительный эффект на полевую устойчивость только в условиях одной местности из четырех исследованных [43]. Сообщалось также, что *pm5a* обуславливал возрастную устойчивость, когда сочетался с иными *Pm*-генами [44]. Экспрессия *pm5*-опосредованной устойчивости в стадии взрослого растения сильно зависит от генетического фона растения-хозяина и популяции патогена, которая может полностью или частично нейтрализовать этот важный ген устойчивости из-за его использования в сортах, возделываемых на больших площадях.

Во многих исследованиях указывается также на совпадение локализации известных главных генов устойчивости пшеницы к стеблевой ржавчине с QTLs количественной резистентности. Так, например, было показано, что устойчивость сорта HD2009 контролируется несколькими QTLs, три из которых проявлялись в разных условиях среды, в том числе один из них, предполагается, является расоспецифическим ювенильным главным геном *Sr30* [45]. У французского сорта мягкой озимой пшеницы Camp Remy большой QTL длительной устойчивости к желтой ржавчине, по-видимому, является геном *Yr27* [46]. У сорта Attila с медленным развитием болезни также один из QTLs был выявлен в локусе *Yr27* [47]. В другом исследовании показано, что QTL соответствовал ювенильному гену *Yr7* [48]. У сорта Renan один из QTLs является специфическим геном *Yr17* [49]. Таким образом, в ряде случаев в частичную устойчивость пшеницы к желтой ржавчине может вносить вклад остаточный эффект преодоленных генов расоспецифической устойчивости.

Заключение

Преодоленные главные гены расоспецифической устойчивости мягкой пшеницы к биотрофным грибным патогенам могут вносить вклад в полигенную устойчивость. Однако не все из них проявляют остаточный эффект на резистентность. Некоторые являются нейтральными, другие могут снижать степень устойчивости. Это обусловлено специфическим характером взаимодействия преодоленных генов растения-хозяина с различающимися генотипами патогена.

Дифференциальный характер взаимодействия растения-хозяина и патогена при полигенной устойчивости, обуславливаемый эффектами преодоленных расоспецифических генов, является доказательством возможности преодоления такой резистентности. В ходе сопряженной эволюции растения-хозяина и возбудителя болезни преодоленный ген, имеющий некоторый остаточный эффект на устойчивость, может превратиться в ген восприимчивости.

Существует возможность повышения уровня полигенной устойчивости путем пирамидирования преодоленных расоспецифических генов. В ряде случаев сочетания некоторых преодоленных генов резистентности были более эффективны, чем одиночные гены. Однако адаптация патогена происходит и к комбинациям преодоленных генов устойчивости

растения-хозяина. Это свидетельствует о необходимости использования стратегии диверсификации сортов по генам расоспецифической устойчивости, что будет способствовать не только продлению эффективности главных генов, но и более длительному сохранению их остаточных эффектов на полигенную устойчивость в случае преодоления патогеном.

Список использованных источников

1. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance / J.A. Poland [et al.] // Trends in Plant Science. – 2008. – Vol. 14, № 1. – P. 21–29.
2. Luig, N.H. A survey of virulence genes in wheat stem rust, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* / N.H. Luig // Z. Pflanzenzucht. – 1983. – Bd. 90, № 11. – P. 198 s.
3. Parlevliet, J.E. Modern concepts in breeding for resistance to rust diseases / J.E. Parlevliet // Groundnut Rust Disease Proc. Discuss. Group. Meet. Patancheru, 24–28 Sept. 1984 / ICRISAT Center. – India, Patancheru. – 1987. – P. 177–182.
4. Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines / T.C. Marcel [et al.] // New Phytopathology. – 2008. – Vol. 177. – P. 743–755.
5. Slesinski, R.S. Transfer of 35S from wheat to the powdery mildew fungus genotypes / R.S. Slesinski, A.H. Ellingboe // Can. J. Bot. – 1971. – Vol. 49, № 2. – P. 303–310.
6. Ellingboe, A.H. Genetics and physiology of primary infection by *Erysiphe graminis* / A.H. Ellingboe // Phytopathology. – 1972. – Vol. 62, № 3. – P. 401–406.
7. Clifford, B.C. Stable resistance to cereal diseases. Problems and progress / B.C. Clifford // Rep. Wilsh. Plant Breed. Stn. – 1974/75. – P. 107–113.
8. The residual effects of some “defeated” powdery mildew resistance genes in isolines of Chancellor winter wheat / H.A. Nass [et al.] // Phytopathology. – 1981 a. – Vol. 71, № 12. – P. 1315–1318.
9. The residual effects of certain “defeated” powdery mildew resistance genes in isolines of Chancellor winter wheat / H.A. Nass [et al.] // Phytopathology. – 1981 b. – Vol. 71, № 2. – P. 249.
10. Partial resistance of near-isogenic wheat lines compatible with *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* / M.H. Royer [et al.] // Phytopathology. – 1984. – Vol. 74, № 8. – P. 1001–1006.
11. Reduced receptivity to infection associated with wheat gene *Lr2c* for low reaction to *Puccinia recondita* / R.S. Modavi [et al.] // Phytopathology. – 1985. – Vol. 75, № 5. – P. 573–576.
12. Одинцова, И.Г. Генетика устойчивости пшеницы к бурой ржавчине и стратегия селекции: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.15 / И.Г. Одинцова; ЛГУ. – Л., 1988. – 32 с.
13. Interaction of genes for pathogenicity and virulence in *Trichometasphaeria turcica* with different numbers of genes for vertical resistance in *Zea mays* / R.R. Nelson [et al.] // Phytopathology. – 1970. – Vol. 60, № 8. – P. 1250–1254.
14. Martin, T.J. Differences between compatible parasite/host genotypes involving the *Pm4* locus of wheat and the corresponding genes in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* / T.J. Martin, A.H. Ellingboe // Phytopathology. – 1976. – Vol. 66. – P. 1435–1438.
15. Nagassa, M. Possible new genes for resistance to powdery mildew, *Septoria glume blotch* and leaf rust of wheat / M. Nagassa // Plant Breed. – 1987. – Vol. 98. – P. 37–46.
16. Mapping QTL involved in adult plant resistance to powdery mildew in the winter wheat line RE714 in two susceptible genetic backgrounds / D. Mingeot [et al.] // Plant Breeding. – 2002. – Vol. 121. – P. 133–140.
17. Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. II. Adult plant resistance / S. Paillard [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – Vol. 101, № 3. – P. 457–462.
18. Anderson, M.G. Interpreting residual effects of “defeated” resistance genes / M.G. Anderson // Phytopathology. – 1982. – Vol. 72, № 11. – P. 1383–1384.

19. The race specific resistance gene to powdery mildew, *MIRE*, has a residual effect on adult plant resistance of winter wheat line RE714 / N. Chantret [et al.] // *Phytopathology*. – 1999. – Vol. 89. – P. 533–539.
20. Wolfe, M.S. Changes and diversity in populations of fungal pathogens / M.S. Wolfe // *Ann. Appl. Biol.* – 1973. – Vol. 75. – P. 132–136.
21. Одинцова, И.Г. Горизонтальная устойчивость пшеницы к бурой ржавчине, связанная с неэффективными генами вертикальной устойчивости. Сообщение 1. Устойчивость моногенных линий пшеницы серии Thatcher / И.Г. Одинцова, Л.А. Михайлова // *Генетика*. – 1988. – Т. 24, № 6. – С. 1041–1047.
22. Residual and interactive expressions of «defeated» wheat stem rust resistance genes / U. Brodny [et al.] // *Phytopathology*. – 1986. – Vol. 76. – P. 546–549.
23. Nelson, R.R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases / R.R. Nelson // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1978. – Vol. 16. – P. 359–378.
24. Nelson, R.R. The evolution of parasitic fitness / R.R. Nelson // *Plant disease* (Horsfall J.C., Cowling E.B. eds.). – New York: Academic press, 1979. – Vol. 5. – P. 23–46.
25. Nelson, R.R. The effect of pyramiding “defeated” wheat powdery mildew resistance genes on components of “slow mildewing” / R.R. Nelson // *Phytopathology*. – 1982. – Vol. 72. – P. 932.
26. Residual resistance in wheat to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* / S.C. Sharma [et al.] // *Plant Disease Research*. – 1991. – Vol. 6, № 2. – P. 70–74.
27. Samborski, D.J. Enhancement of resistance to *Puccinia recondita* by interactions of resistance genes in wheat / D.J. Samborski, P.L. Dyck // *Can. J. Plant. Pathol.* – 1982. – Vol. 4, Issue 2. – P. 152–156.
28. Pederson, W.L. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects / W.L. Pederson // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 1988. – Vol. 26. – P. 369–378.
29. Young, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants / N.D. Young // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1996. – Vol. 34. – P. 479–501.
30. Complex genetic networks underlying the defensive system of rice (*Oryza sativa* L.) to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* / Z.K. Li [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – Vol. 103. – P. 7994–7999.
31. Parlevliet, J.E. The integrated concept of disease resistance: A new view including horizontal and vertical resistance in plants / J.E. Parlevliet, J.C. Zadoks // *Euphytica*. – 1977. – Vol. 26. – P. 5–21.
32. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar / G.L. Wang [et al.] // *Genetics*. – 1994. – Vol. 136. – P. 1421–1434.
33. Mapping of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) in maize (*Zea mays* L.) / W. Xiao [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2007. – Vol. 115. – P. 501–508.
34. Gebhardt, C. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome / C. Gebhardt, J.P.T. Valkonen // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2001. – Vol. 39. – P. 79–102.
35. Identification and characterization of regions of the rice genome associated with broad-spectrum, quantitative disease resistance / R.J. Wisser [et al.] // *Genetics*. – 2005. – Vol. 169. – P. 2277–2293.
36. Huang, X.Q. Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: a review / X.Q. Huang, M.S. Roder // *Euphytica*. – 2004. – Vol. 137. – P. 203–223.
37. Chromosomal location of powdery mildew gene *Pm16* in wheat using SSR marker analysis / X.M. Chen [et al.] // *Plant Breed.* – 2005. – Vol. 124. – P. 225–228.
38. A major QTL effect controlling resistance to powdery mildew in winter wheat at the adult plant stage / Y. Bougot [et al.] // *Plant Breeding*. – 2006. – Vol. 125, № 6. – P. 550–556.
39. Quantitative trait loci mapping for adult plant resistance to powdery mildew in bread wheat / S.S. Liang [et al.] // *Phytopathology*. – 2006. – Vol. 96, № 7. – P. 784–789.
40. Genetic analysis of powdery mildew resistance in German winter wheat cultivar Cortez / V. Mohler [et al.] // *Plant Breeding*. – 2011. – Vol. 130. – P. 35–40.
41. Identification of a microsatellite marker associated with *Pm3* resistance alleles to powdery mildew in wheat / Y. Bougot [et al.] // *Plant Breed.* – 2002. – Vol. 121. – P. 325–329.
42. Quantitative trait loci for resistance against powdery mildew in a segregating wheat × spelt population / M. Keller [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1999. – Vol. 98. – P. 903–912.

43. The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar / M. Lillemo [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – Vol. 116. – P. 1155–1166.
44. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 6. Alleles at the *Pm5* locus / S.L.K. Hsam [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2001. – Vol. 102, № 1. – P. 127–133.
45. Molecular mapping of stem rust resistance in HD2009/WL711 recombinant inbred line population / J. Kaur [et al.] // International Journal of Plant Breeding. – 2009. – Vol. 3. – P. 29–33.
46. Quantitative trait loci for resistance against yellow rust in two wheat-derived inbred wheat line populations / N. Boukhatem [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – Vol. 104. – P. 111–115.
47. Quantitative trait loci for slow-rusting resistance in wheat to leaf rust and stripe rust identified with multi-environment analysis / G.M. Rosewarne [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – Vol. 116. – P. 1027–1034.
48. Genetic analysis of durable resistance to yellow rust in bread wheat / S. Mallard [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2005. – Vol. 110. – P. 1401–1409.
49. Characterization of genetic components involved in durable resistance to stripe rust in the bread wheat «Renan» / F. Dedryver [et al.] // Phytopathology. – 2009. – Vol. 99. – P. 969–973.

Дата поступления статьи 24 февраля 2014 г.

ОЦЕНКА ГИБРИДОВ F₄ ОЗИМОГО ТРИТИКАЛЕ, СОЗДАННЫХ НА ОСНОВЕ ОБРАЗЦОВ РАЗЛИЧНОГО ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ПО ОСНОВНЫМ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫМ ПРИЗНАКАМ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

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

²УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»

Республика Беларусь, 213407, г. Горки, ул. Мичурина, 5

Введение

Тритикале является самой молодой зерновой культурой и первым злаком, синтезированным человеком. Данная культура создавалась с надеждой на объединение в одном организме высокой продуктивности и качества зерна пшеницы с устойчивостью к абиотическим и биотическим факторам среды ржи. В настоящее время создано много высокоурожайных сортов тритикале, которые успешно выращиваются в районах, почвенно-климатические условия которых мало пригодны для возделывания пшеницы. Однако современным сортам все еще присущ ряд недостатков. В частности, они поражаются корневыми гнилями, снежной плесенью, септориозом, а также требуют повышения зимостойкости и устойчивости к предуборочному прорастанию [1, 2]. Одним из путей решения этих проблем является расширение и обогащение генофонда тритикале за счет использования нового исходного материала [3, 4]. В Институте генетики и цито-

логии НАН Беларуси имеется коллекция линий озимого тритикале из Международного центра по улучшению кукурузы и пшеницы (CIMMYT), которая является носителем новых генетических источников. С целью расширения генофонда тритикале для скрещивания по схеме топкросса 6 × 4 в качестве материнских форм использовали образцы из Мексики и 4 линии, созданные в Институте генетики и цитологии. Ранее нами проведена оценка продуктивности, зимостойкости и устойчивости к наиболее распространенным грибным патогенам полученных 24 гибридов F₂, на основе которой выделено 5 комбинаций с высокими показателями по изученным признакам. Цель данной работы состояла в изучении экспрессии генов адаптации и продуктивности у отобранных перспективных гибридов озимого тритикале, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили растения 5 гибридных комбинаций тритикале F₄ - M13/Восход × 4м, 105/12-2 × 2м, 2м × 105/12-2, 42м × 105/12-1, 44м × Опал/Восход. Данный гибридный материал выделен как наиболее перспективный в результате оценки по основным хозяйственно важным показателям 24 гибридов озимого тритикале F₂, полученных в результате скрещивания в системе топкросса шести сортообразцов из коллекции Международного центра по улучшению кукурузы и пшеницы (CIMMYT, Мексика) - 2м, 4м, 16м, 29м, 42м, 44м [5] и четырех высокопродуктивных форм,

синтезированных в ИГЦ НАН Беларуси - M13/Восход, 105/12-1, Опал/Восход, 105/12-2 [6]. В табл. 1 приведены родословные использованных в гибридизации образцов. Как видно из таблицы, 4 линии тритикале из коллекции CIMMYT, включают генетический материал *T.sharonensis*. Созданные в ИГЦ НАН Беларуси формы тритикале, маркированные генами яровизации M13/Восход и Опал / Восход, получены на основе почти изогенной по данной системе генов линии пшеницы Мироновская 808-13 (Vrn1 Vrn 3), ярового сорта пшеницы Опал (Vrn1 Vrn 2) и озимой диплоидной ржи Восход. Две другие формы 105/12-1 и

105/12-2 выделены из гибридной популяции F₅, полученной от скрещивания позднеспелой линии-двуручки Гл 29-12-1 и озимого образца тритикале МВ-1 из коллекции ВИР. Линии,

маркированные доминантными *Vrn*-генами, генетически отличаются от мексиканских образцов тритикале, что подтверждено результатами молекулярного анализа [7].

Таблица 1

Происхождение и родословные образцов озимого тритикале, использованных в гибридизации

Образец	Происхождение	Родословная
2м	СИММУТ, Мексика	<i>T.sharonensis</i> /1087//Alamo (Presto)/3/CHD 1089
4м		<i>T.sharonensis</i> /1087//Alamo (Presto)/3//Presto 6D (6A)
16м		Presto ID (1A) (2+12)// <i>T.sharonensis</i> /1087
29м		<i>T.sharonensis</i> /1087//Alamo (Presto)
42м		Flora//B86-3335/6TB059/3/LT1439.82
44м		НОН10/STAN 1
M13 / Восход	ИГЦ НАН Беларуси	Яровая линия пшеницы Мироновская 808-13 (<i>Vrn1Vrn3</i>)/озимая рожь Восход
105/12-1		Отобрана из F ₅ комбинации линия-двуручка тритикале Гл 29-12-1 × озимое тритикале МВ-1
Опал/Восход		Яровая пшеница Опал (<i>Vrn1Vrn2</i>)/озимая рожь Восход
105/12-2		Отобрана из F ₅ комбинации линия-двуручка тритикале Гл 29-12-1 × озимое тритикале МВ-1

Контролем служил районированный в Беларуси сорт озимого тритикале Михась.

Эксперимент проводили на опытном поле кафедры селекции и генетики УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия» в 2012–2013 гг. Почвы опытного участка дерново-среднеподзолистые, развивающиеся на лессовидном суглинке, подстилаемом мореной с глубиной пахотного горизонта 17–22 см. Почва по содержанию основных элементов питания среднеобеспеченна. Содержание гумуса в почве 1,52–1,81%. Подвижных форм фосфора – 180–190 мг/кг почвы, калия – 152–176 мг/кг почвы. Реакция почвенной среды слабокислая (рН = 5,6–6,1).

Для оценки зимостойкости осенью и весной подсчитывали число растений на делянках и по соотношению числа перезимовавших растений к числу взошедших осенью определяли процент перезимовки каждого образца.

Степень поражения снежной плесенью определяли по шкале от 0 до 4 баллов [8].

Устойчивость гибридов тритикале к мучнистой росе (*Blumeria tritici*), септориозу (*Septoria nodorum*, *Septoria tritici*) и к бурой ржавчине (*Puccinia triticea*) оценивали по 9-ти балльной шкале на естественном инфекционном фоне. Поражение мучнистой росой учитывали в фазу кущения и колошения, септориозом – в фазу колошения, бурой ржавчиной – в фазу колошения и молочной спелости [9].

Степень полегания гибридов определяли перед уборкой по 5-балльной системе [9].

С целью определения продуктивности исследуемых образцов анализировали показатели: продуктивная кустистость, длина главного колоса, число колосков и зерен главного колоса, масса зерна с колоса и растения, урожайность.

Результаты и обсуждение

Озимые зерновые культуры по сравнению с яровыми имеют очень продолжительный период потребления элементов питания, начинающийся осенью и заканчивающийся на следующий год к фазе цветения. Благодаря развитой корневой

системе они хорошо используют осеннюю и весеннюю влагу. Самыми ответственными периодами в питании озимых культур являются 2 периода: от всходов до ухода посевов в зиму и весной в начале возобновления вегетации.

Преобладание теплой погоды осенью 2012 г. и достаточные запасы влаги в почве способствовали хорошему развитию озимых посевов. Изучаемые образцы озимых тритикале к моменту прекращения вегетации находились в фазе кущения, что важно для хорошей перезимовки и формирования высокой урожайности. Однако перезимовка сельскохозяйственных культур проходила в довольно сложных агрометеорологических условиях. Под влиянием оттепельной погоды в феврале произошло уменьшение глубины промерзания почвы, в результате чего температура почвы на глубине залегания узла кущения была выше оптимальных значений и колебалась от –1 до +1 °С. При таких температурах у растений происходит повышенный расход питательных веществ, особенно сахаров, что ведет к их ослаблению. Кроме того, возобновление вегетации озимых культур в 2013 г. произошло значительно позже прошлогодних сроков, что также способствовало их истощению. Все это привело к повышенной изреженности озимых зерновых культур по всей республике.

Оценка состояния гибридов озимого тритикале после зимнего периода показала, что процент их перезимовки колебался от 58 % до 91%, у стандарта – сорта Михась, он составил 82%. Самый большой показатель по данному признаку отмечен для растений комбинации 42м × 105/12-1. Для большинства изученных образцов сохранность растений была достаточно высока – не менее 70 – 80%. Так, для 105/12-2 × 2м процент перезимовки составил 79%, 2м × 105/12-2 – 74%, 44м × Опал/Восход – 72%. Низкая зимостойкость характерна только для гибрида М13/Восход × 4м: сохранилось чуть более половины растений данной комбинации (58%).

Непромерзлая почва и снежный покров создают благоприятные условия (низкая освещенность и высокое содержание CO₂) для развития снежной плесени. В последнее десятилетие отмечаются частые эпифитотии данного заболевания, которые, как правило, сопровождаются гибелью растений, даже в южной части республики. Метеорологические условия в зимний период 2012–2013 гг.

способствовали развитию данной болезни, вследствие чего все растения тритикале поражались снежной плесенью в той или иной степени. Необходимо отметить, что для 4 из 5 изученных гибридных образцов степень поражения данным заболеванием была невелика и составила 2 балла, как у сорта-стандарта Михась. Среди гибридного материала выделился образец 42м × 105/12-1, для которого отмечены редкие пятна на нижних и верхних листьях (1–3 пятна) при общей пораженности до 10% листовой поверхности (1 балл). Наибольшая степень поражения (3 балла) наблюдалась для растений М13/Восход × 4м. У растений этой комбинации было поражено до 70% листовой поверхности и наблюдалось отмирание боковых побегов.

Наряду со снежной плесенью наиболее распространенными патогенами, поражающими посевы озимого тритикале на территории Беларуси, являются мучнистая роса (*Blumeria tritici*), септориоз (*Septoria nodorum*, *Septoria tritici*), бурая ржавчина (*Puccinia triticina*). С целью выделения устойчивых к данным патогенам генотипов была осуществлена оценка гибридов тритикале F₄, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения (табл. 2). Сложившиеся погодные условия 2013 г. способствовали распространению и развитию мучнистой росы озимых зерновых культур. Болезнь была выявлена во всех областях республики. В отличие от других болезней злаков, мучнистая роса поражает все вегетативные органы, а заражение и развитие может происходить на протяжении всего вегетационного сезона (формируется 10–20 генераций). Особенно распространено данное заболевание на восприимчивых сортах, в загущенных посевах и на площадях ранних сроков сева. Несмотря на благоприятные условия для развития мучнистой росы, исследованные генотипы проявили высокую устойчивость к данному патогену. Большинство гибридов так же, как и стандарт – сорт тритикале Михась – характеризовались наличием только единичных мелких пустул на поверхности листа. Необходимо отметить образец 42м × 105/12-1, который не поражен данным патогеном (табл. 2).

Таблица 2

Устойчивость озимых тритикале к мучнистой росе (патоген – *B. tritici*), септориозу (патогены – *S. nodorum* и *S. tritici*) и бурой ржавчине (патоген – *P. triticina*)

Генотип	Устойчивость, балл		
	Мучнистая роса	Септориоз	Бурая ржавчина
M13/Восход × 4м	7	7	7
105/12-2 × 2м	7	7	7
2м × 105/12-2	7	7	7
42м × 105/12-1	9	9	7
44м × Опал/Восход	7	9	7
Михась	7	7	7

Для гибридов тритикале, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения, отмечена также определенная степень резистентности к септориозу: M13/Восход × 4м, 2м × 105/12-2, 105/12-2 × 2м обладали высокой устойчивостью на уровне стандарта (7 баллов), 42м × 105/12-1 и 44м × Опал/Восход превосходили по данному показателю стандарт и продемонстрировали наибольшую устойчивость к септориозу (9 баллов).

Анализ поражения бурой ржавчиной озимых тритикале в условиях естественного инфекционного фона показал, что все генотипы, изученные нами, обладали высокой устойчивостью к данному патогену (табл. 2). В фазу колошения и молочной спелости на листьях растений тритикале обнаружены единичные мелкие пустулы, что соответствует 7 баллам из 9.

По результатам оценки зимостойкости и устойчивости к ряду заболеваний гибридов тритикале созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения, можно выделить комбинацию 42м × 105/12-2, растения которой наряду с комплексной устойчивостью к патогенам характеризовались самой высокой степенью перезимовки.

Еще одна характеристика тритикале, которая важна для селекции этой культуры – устойчивость к полеганию. Большинство белорусских сортов тритикале характеризуются относительно высокой соломиной и, как следствие, склонностью к полеганию, что, в свою очередь, приводит к затенению растений и повышению поражаемости болезнями. Потери зерна от полегания у культурных

злаков могут колебаться от 20 до 50%, а в особенно неблагоприятные годы доходить до 80%. Все это обуславливает необходимость усиления селекционной работы по созданию сортов тритикале, устойчивых к полеганию. В связи с этим перед уборкой была проведена оценка устойчивости к полеганию 5 гибридных комбинаций и сорта тритикале Михась. Согласно нашим наблюдениям, изученные генотипы практически не полегали. Только растения комбинации 44м × Опал/Восход были слегка наклонены, что соответствовало 4 баллам по 5-ти бальной шкале. Можно отметить, что данный образец был самый высокорослый из испытанных – 115,8 см. Остальные гибриды характеризовались высокой устойчивостью к полеганию (балл 5) и высота их растений составила 105,4–115 см.

К недостаткам тритикале также относятся большое варьирование по годам продуктивности и слабая выполненность зерна, в связи с чем, одним из направлений, на котором сосредоточены усилия селекционеров, является увеличение потенциала урожайности тритикале. Для определения продуктивности озимого тритикале анализировали основные количественные показатели, представленные в табл. 3.

По продуктивной кустистости гибриды тритикале были, как правило, на уровне стандарта (3,8 шт.), а M13/Восход × 4м и 42м × 105/12-2 превосходили его по числу продуктивных стеблей – 4,2 и 4,3 шт. соответственно. Длина колоса у исследованного материала колебалась от 9,2 до 11,1 см. Только образец 44м × Опал/Восход превышал по данному параметру стандарт (табл. 3). Наименьшая длина колоса выявлена

для М13/Восход × 4м, что обусловило невысокие показатели и по остальным признакам продуктивности. Так, по числу зерен с колоса, массе зерна с растения и урожайности данный образец характеризовался наименьшими значениями среди изученных гибридов тритикале (табл. 3). По признаку «число колосков в колосе» гибридный материал существенно не отличался от сорта Михась (табл. 3). Число зерен в колосе у гибридных образцов варьировало в пределах 39,6–45,8 шт., что несколько ниже по сравнению со стандартом, у которого данный показатель равен 48,2 шт. Наибольшее значение по данному признаку отмечено для 42м × 105/12-2 –

45,8 шт. Эту комбинацию можно выделить и по признаку «масса зерна главного колоса»: наряду с комбинацией 44м × Опал/Восход она превосходила стандарт по данному показателю продуктивности (табл. 3). Необходимо отметить, что эти образцы не уступали сорту Михась и по признаку «урожайность», а 44м × Опал/Восход даже превосходил стандарт по данному параметру (табл. 3). По результатам изучения основных элементов продуктивности следует выделить комбинации 42м × 105/12-2 и 44м × Опал/Восход, так как по большинству анализируемых признаков они не уступали стандарту, а иногда и превосходили его.

Таблица 3

Характеристика озимого тритикале по основным признакам продуктивности

Генотип	Продуктивная кустистость, шт	Длина главного колоса, см	Число колосков в колосе, шт.	Число зерен главного колоса, шт.	Масса зерен главного колоса, г	Масса зерен растения, г	Урожайность, г/м ²
М13/Восход × 4м	4,2	9,2	24,9	39,6	1,79	3,48	516
105/12-2 × 2м	3,7	10,6	24,6	45,4	1,89	5,22	622
2м × 105/12-2	3,6	10,4	26,8	44,9	1,74	5,71	590
42м × 105/12-1	4,3	9,8	25,7	45,8	2,20	4,75	747
44м × Опал/Восход	3,8	11,1	25,6	44,5	2,10	4,43	820
Михась	3,8	10,7	26,4	48,2	1,98	5,20	760

Заключение

По результатам испытания гибридов тритикале F₄, созданных с участием образцов из коллекции Международного центра по улучшению кукурузы и пшеницы (СІМ-МҮТ, Мексика), выявлены генотипы с высокой продуктивностью и устойчивостью к воздействиям биотических и абиотических

стрессов. Гибриды 42м × 105/12-2 и 44м × Опал/Восход по основным хозяйственно ценным признакам не уступали стандарту, а иногда и превосходили его, что позволяет рекомендовать их для использования в селекционных программах по созданию новых сортов озимых тритикале.

Список использованных источников

1. Булавина, Т.М. Оптимизация приемов возделывания тритикале в Беларуси / Т.М. Булавина. – Минск: ИВЦ Минфина, 2005. – 224 с.
2. Интегрированные системы защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорняков: реком. НИРУП «БелИЗР» / под ред. С.В. Сороки. – Минск: ИВЦ Минфина, 2003. – Кн. 1. – 248 с.
3. Gruszecka, D. Yield structure of triticales strains achieved due to crossbreeding with *Ae-*

gilops / D. Gruszecka, K. Kowalczyk // Proc. 5th Inter. Triticale Symp., Radzikow, Poland, June 30–July 5 2002. – Vol. 2. – P. 345–349.

4. Sodkiewicz, W. Chromosomal location in triticales of leaf rust resistance genes introduced from *Triticum monococcum* / W. Sodkiewicz, A. Strzembicka, B. Apolinska // Plant Breeding. – 2008. – Vol. 127. – P. 364–367.

5. Орловская, О.А. Оценка продуктивности и зимостойкости элитных линий тритикале

из коллекции Международного центра по улучшению кукурузы и пшеницы в условиях Беларуси / О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси, 19–22 июня 2012 г. Минск, Беларусь. – Минск, 2012 – Ч. 2. – С 333–335.

6. Khotyljova, L.V. Development and study of spring triticale lines with *Vrn* genes / L.V. Khotyljova, L.V. Koren, L.N. Kaminskaya // 4th International Triticale Symposium, 26–31 July 1998

Alberta, Canada. – Alberta, 1998. – P. 21–23.

7. Орловская, О.А. ISSR-анализ образцов озимого тритикале (*×Triticosecale* Wittmack) различного эколого-географического происхождения / О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева // Доклады НАНБ. – 2012. – Т. 56, № 2. – С. 78–81.

8. Методические указания по регистрационному испытанию фунгицидов в сельском хозяйстве / под ред. С.Ф. Буга. – РУП Институт защиты растений, 2007. – С. 61–101.

9. Коновалов, Ю.Б. Практикум по селекции и семеноводству полевых культур / Ю.Б. Коновалов. – М.: Агропромиздат, 1987. – 367 с.

Дата поступления статьи 3 мая 2014 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЭСТРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА *ESR1-PvuII*, МАРКЕРА ПЛОДОВИТОСТИ СВИНЕЙ, С ПОМОЩЬЮ HRM-АНАЛИЗА

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Различия в уровне продуктивности между отдельными животными, линиями и породами обусловлены, с одной стороны, средовыми, а с другой – генетическими факторами. Большинство хозяйственно полезных признаков сельскохозяйственных животных относится к полигенным признакам, т.е. их количественный уровень генетически определяется целым рядом генов (локусов), разбросанных по всему геному. Такие локусы получили название локусов количественных признаков (QTLs, Quantitative Trait Loci) [1]. Одним из перспективных направлений использования QTLs в животноводстве является молекулярно-генетический анализ генов-кандидатов, которые кодируют ключевые белки, ответственные за проявления признака.

Важным фактором, влияющим на эффективность производства свинины, является репродуктивный выход. Выявление молекулярных маркеров, влияющих на показатели воспроизводства – на первом плане у многих молекулярных генетиков и селекционеров. Для управления селекционным процессом и ведения генетического мониторинга в свиноводстве значительный интерес представляет ген эстрогенового рецептора *ESR1*, являющийся ДНК-маркером плодовитости свиней [2].

Эстрогены – стероидные половые гормоны, способные регулировать рост, дифференцировку и функции в различных клетках и тканях млекопитающих, играющие центральную роль в регуляции процессов размножения. Проводниками гормональных сигналов являются эстрогеновые рецепторы (ESR), представленные в клетках-мишенях органов животных. В настоящее время широко известны два типа эстрогеновых рецепторов – ESR1 и ESR2, которые являются

транскрипционными факторами, имеющими центры связывания с регуляторными участками ДНК (промоторами, энхансерами). Гены *ESR* у свиньи локализованы на коротком плече 1 хромосомы (SSC1) в регионе p.2.5–p.2.4 [3]. Ген *ESR1* получил наиболее широкое распространение в качестве генетического маркера плодовитости свиней.

Для *ESR1-PvuII* полиморфизма характерна взаимосвязь с репродуктивными признаками свиней породы крупная белая (масса гнезда при рождении, процент мертворожденных поросят и т.д.) [4]. Свиноматки с различными генотипами отличаются по воспроизводительным качествам. Установлено положительное влияние аллеля В на воспроизводительную функцию свиней, в частности, на многоплодие свиней английской крупной белой породы. Свиньи этой породы получили данный аллель от китайской многоплодной породы мэйшан в процессе ее создания в XIX в. с последующей передачей аллеля породам, созданным с участием крупной белой свиньи. В результате исследований установлено, что предпочтительным с точки зрения селекции является генотип ВВ. Превосходство по многоплодию маток составило 0,9 поросенка по сравнению с генотипом АА, а по размерам гнезда на 0,7–1,4 поросенка [5, 6].

В настоящее время для определения полиморфизма *ESR1-PvuII* используется традиционный метод анализа ПЦР-ПДРФ, который является достаточно длительным по времени и затратным. Цель работы заключалась в разработке достоверного и недорогого экспресс-метода для определения полиморфизма *ESR1-PvuII* с использованием технологии HRM для массового скрининга животных, а также оценка его эффективности в сравнении с методом ПЦР-ПДРФ.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования в работе были использованы свиньи белорусской крупной белой породы. Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из биологического материала – проб ткани (ушной выщип) и цельной крови. Для выделения ДНК использовали набор реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб» (Праймтех, Беларусь). Была проанализирована выборка животных ($n = 125$) по полиморфизму *ESR1-PvuII* гена эстрогенового рецептора. Количество выделенной ДНК определяли с помощью Qubit® 2.0 Fluorometer с использованием набора Molecular probes Qubit® ds DNA BR Assay kit (Life technologies, США). Для постановки ПЦР-РВ и проведения HRM-анализа геномная ДНК образцов была нормализована (концентрация 4 нг/мкл).

ПЦР-ПДРФ метод. Для амплификации фрагмента гена *ESR1* длиной 120 п.н. использованы прямой праймер 5'-ССТGTT TTTACAGTGACTTTTACAGAG-3' и обратный праймер 5'-CACTTCGAGGGTCACTC-CAATTAG-3' (Short, 1997) [7]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала деионизированную воду, 1× ПЦР буфер, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 мкМ смеси dNTP, 300 нМ каждого праймера, 1,5 U Taq-полимеразы (Thermo scientific, Литва) и 50 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили на приборе C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при следующих условиях: 94 °C – 4 мин; 35 циклов: 94 °C – 30 с, 58 °C – 40 с, 72 °C – 40 с; 72 °C – 5 мин. Рестрикция продуктов амплификации длилась в течение ночи при 37 °C с использованием рестриктазы PvuII (“Thermo scientific”, Литва). Идентификацию фрагментов после рестрикционного анализа проводили в 4%-ном агарозном геле (SeaKem® LE Agarose, Lonsa) с использованием интеркалирующего красителя ZUBR Green-1 (Праймтех, Беларусь) относительно маркера молекулярных масс DNA Ladder (Thermo scientific, Литва).

Секвенирование ДНК. Специфичные ПЦР-продукты изучаемого локуса гена *ESR1* вырезали из геля и очищали с помощью набора реагентов

Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo scientific, Литва) согласно прилагаемой производителем инструкции по применению. Для постановки секвенирующей ПЦР использовали Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Секвенирующую ПЦР проводили согласно следующим условиям: 96 °C – 1 мин; 25 циклов: 96 °C – 10 с, 50 °C – 5 с, 60 °C – 4 мин; 16 °C – 5 мин. ПЦР-продукты после секвенирующей ПЦР очищали от непрореагировавших флуоресцентно меченых терминаторных нуклеотидов переосаждением этанолом/ Na_2 ЭДТА. Определение нуклеотидной последовательности проводили на 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

HRMA (High Resolution Melting Analysis). Образцы геномной ДНК животных ($n = 51$) анализировали с использованием технологии HRM-анализа на приборе CFX96 (BioRad, США). Для амплификации фрагмента гена длиной 120 п.н. использованы праймеры, описанные ранее (Short, 1997). Реакционная смесь в общем объеме 25 мкл содержала 1× ПЦР мастер-микс (Синтол, Россия) с интеркалирующим красителем EvaGreen, 500 нМ каждого праймера и по 20 нг ДНК каждого образца. Условия проведения амплификации и HRM-анализа были следующими: 95 °C – 5 мин.; 35 циклов: 95 °C – 10 с, 63 °C – 30 с, 72 °C – 15 с; 94 °C – 1 мин., 72 °C – 30 с; Melt Curve 72 °C–85 °C: Increment 0,2°C – 5 с. Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения для HRM-анализа Precision Melt Analysis™ software.

Пост-HRM секвенирование. После определения генотипов методом HRM по 4 образца из каждого кластера с генотипами AA, BB, AB были секвенированы. Полученные ПЦР-продукты после HRM-анализа очищали с помощью набора реагентов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo scientific, Литва). Секвенирующую ПЦР ставили с использованием BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Определение нуклеотидной последовательности проводили на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США).

Результаты и обсуждение

Выборка свиней ($n = 125$) белорусской крупной белой породы исследована для определения полиморфизма *ESR1-PvuII* методом ПЦР-ПДРФ. Выявлено 58 особей с гомозигот-

ным генотипом AA, 16 особей с гомозиготным генотипом BB и 51 особь с гетерозиготным генотипом AB. Частоты встречаемости аллелей и генотипов представлены в табл. 1.

Таблица 1

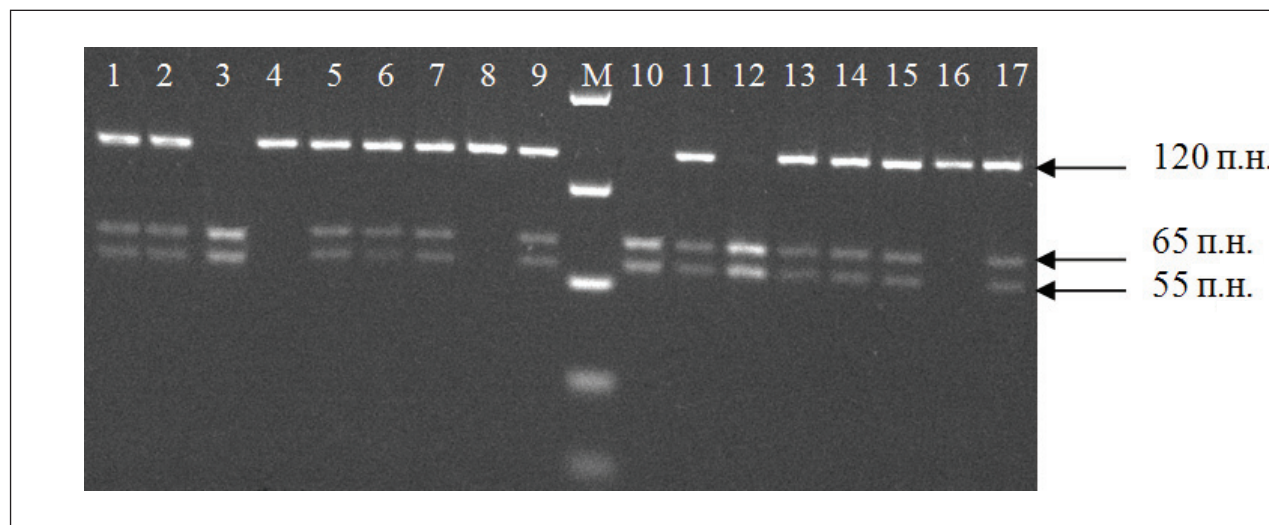
Генетическая структура выборок из популяций разных пород и помесей свиней

Геноти- пы	Породы и помеси свиней																	
	Белорусская крупная белая			Белорусская черно- пестрая			БЧПхД			Дюрок			КБхЛ			КБхЙ		
	Ф	Т	X ²	Ф	Т	X ²	Ф	Т	X ²	Ф	Т	X ²	Ф	Т	X ²	Ф	Т	X ²
АА	14	15,75	0,81	14	15,2	1,99	6	5,4	1,15	19	19	0,01	3	2,45	1,37	2	1,8	0,14
АВ	34	30,5		11	8,6		2	3,1		1	0,99		1	2,1		2	2,4	
ВВ	13	14,75		0	1,2		1	0,4		0	0,01		1	0,45		1	0,8	
Аллели	Частоты аллелей ± Sp																	
А	0,508±0,064			0,780±0,083			0,778±0,138			0,975±0,035			0,700±0,205			0,600±0,219		
В	0,492±0,064			0,220±0,083			0,222±0,138			0,025±0,035			0,300±0,205			0,400±0,219		

Примечание: БЧП × Д – белорусская черно-пестрая × дюрок, КБ × Л – крупная белая × ландрас, КБ × Й – крупная белая × йоркшир, Ф – фактическое число особей, Т – теоретическое число особей, χ^2 – критерий хи квадрат.

Частота предпочтительного по признаку многоплодия аллеля В составила 0,332. Все изученные популяции находились в состоянии генетического равновесия по закону Харди-Вайнберга. У свиней породы белорусская крупная белая выявлена наибольшая частота предпочтительного аллеля

В (0,492) в сравнении с особями породы дюрок, где частота предпочтительного генотипа составила (0,025). Результаты ПЦР-ПДРФ анализа, полученные с помощью системы гель-документирования Quantum ST4 («Vilber lourman», Франция), представлены на рис. 1.

Рис. 1. Определение полиморфизма *ESRI-PvuII* методом ПЦР-ПДРФ

М – маркер FastRulerUltra Low Range DNA Ladder, дорожки 8, 16 – гомозиготный генотип АА (120 п.н.); дорожки 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 17 – гетерозиготный генотип АВ (120 п.н., 65 п.н., 55 п.н.); дорожки 3, 10, 12 – гомозиготный генотип ВВ (65 п.н., 55 п.н.).

После ПЦР-ПДРФ анализа были отобраны 3 образца с различными генотипами: гомозиготным генотипом АА, гетерозиготным генотипом АВ и гомозиготным генотипом ВВ. Данные образцы были секвенированы с

целью их дальнейшего использования в качестве контрольных образцов для HRM-анализа. Оценка и обработка результатов проводились с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis версия 5.4 (рис. 2).

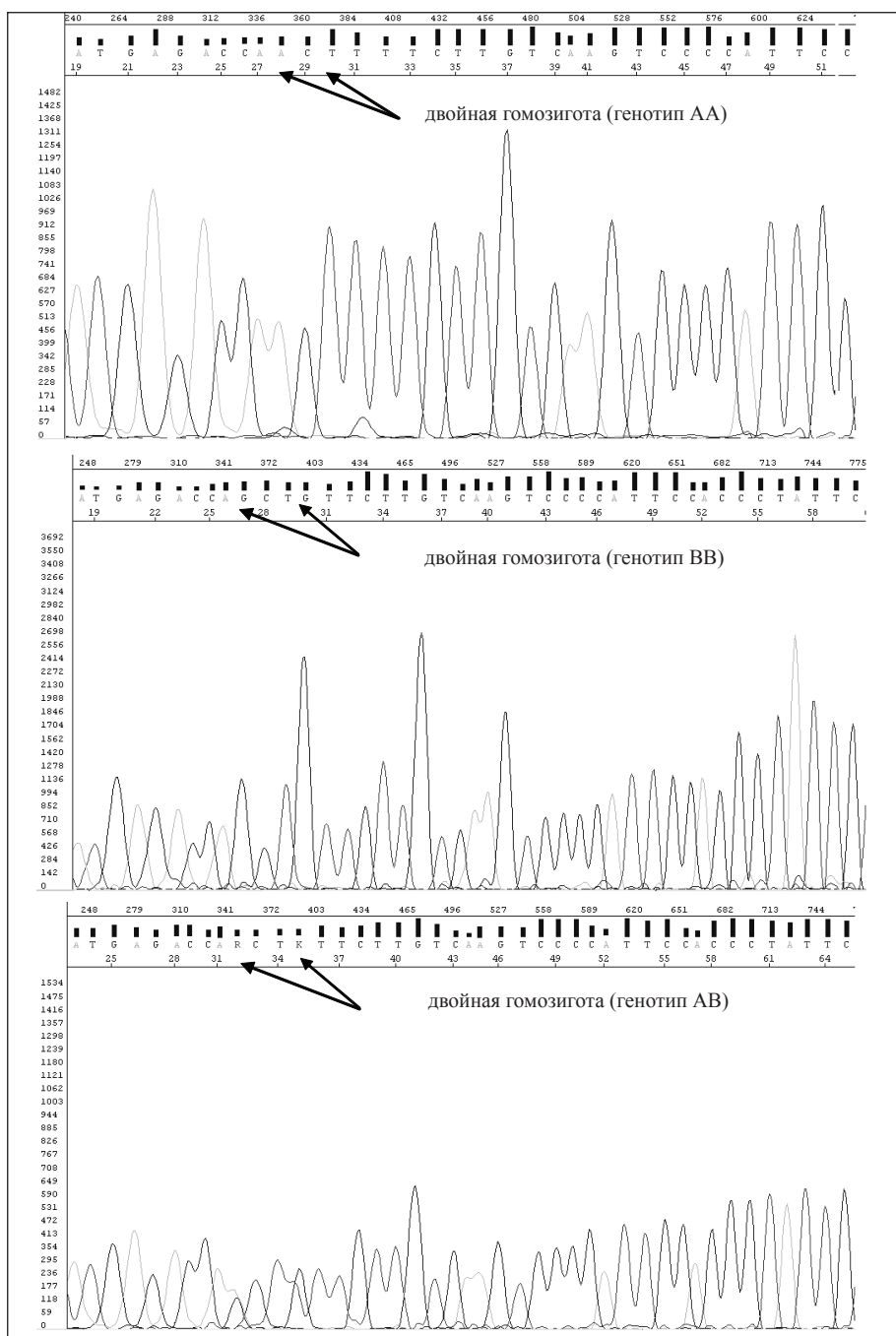


Рис. 2. Секвенирование образцов для выявления полиморфизма *ESR1-PvuII* и определения генотипов AA, BB, AB

По результатам секвенирования было выявлено, что полиморфизм *ESR1-PvuII* включает две однонуклеотидные замены (SNP) 65A→G, 68T→G в гене *ESR1* интрон 3 (GenBank HF947272). Только наличие двух SNP дает сайт рестрикции для эндонуклеазы *PvuII*, что позволяет выявлять особей с генотипом BB.

Из общей выборки исследованных животных были отобраны свиньи белорусской крупной белой породы ($n = 51$) для определе-

ния полиморфизма *ESR1-PvuII* методом ПЦР в реальном времени с использованием HRM-анализа. Анализ HRM был выполнен с помощью программного обеспечения после амплификации специфичного продукта в режиме реального времени. Этот анализ состоял из одного цикла с повышением температуры от 72 °C до 85 °C, где изменения флуоресценции измеряли при каждом подъеме температуры на 0,2 °C в течение 5 с.

Первая реакция амплификации на CFX96 была также проверена на наличие неспецифических продуктов на 4%-ном агарозном геле (рис. 3).

Для определения генотипов в исследуемых образцах использовали кривые плавления (рис. 4). В результате исследуемые образцы

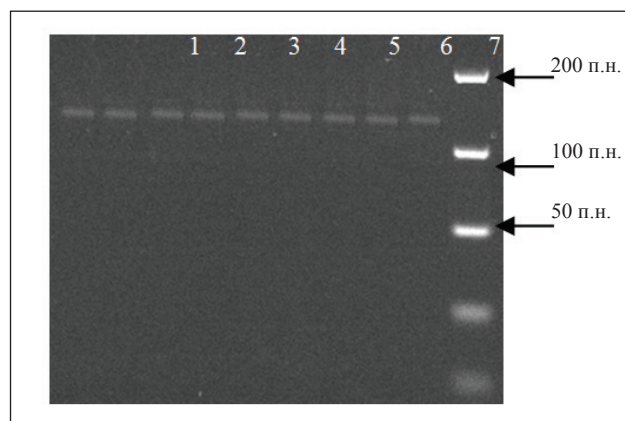


Рис. 3. ПЦР-продукт после HRM-анализа на 4%-ном агарозном геле.

М – маркер FastRulerUltra Low Range DNA Ladder #SM1233, дорожки 1–9 – амплификат (120 п.н.).

образовывали три четких кластера, соответствующие генотипам AA, BB, AB.

Деление на кластеры по результатам HRM анализа было подтверждено пост-HRM-секвенированием, результаты которого представлены на рис. 5 (справа).

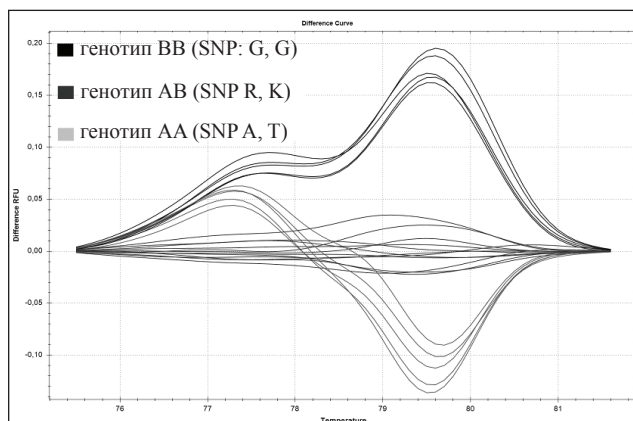


Рис. 4. Результаты HRM-анализа в программе Precision Melt Analysis™ software

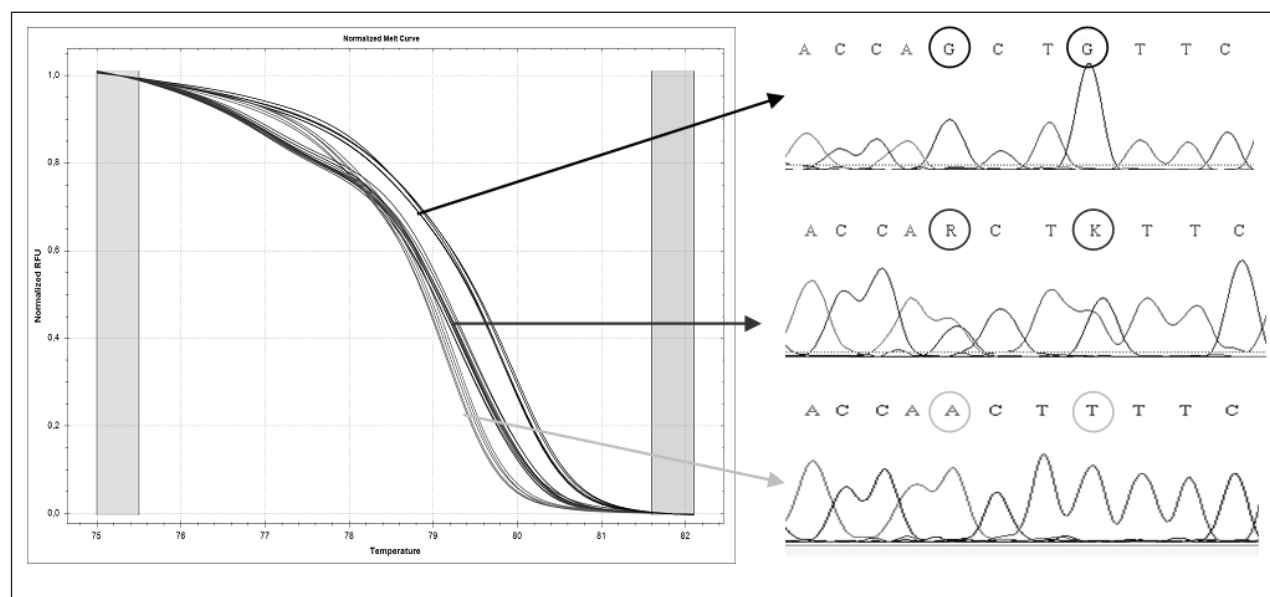


Рис. 5. Результаты пост-HRM-секвенирования

Плавнение с высоким разрешением (High Resolution Melts, HRM) – это технология, используемая после проведения ПЦР в реальном времени, основана на определении различий в кривых плавления (диссоциации ДНК) с помощью специального программного обеспечения. HRM начинается с ПЦР-амплификации интересующей области в присутствии интерка-

лирующего красителя (SYTO® 9, EvaGreen®, SYBR Green I), который имеет высокую флуоресценцию при связывании с дцДНК и низкую флуоресценцию в свободном состоянии. Далее осуществляется плавление продукта: двойная спираль ДНК диссоциирует с высвобождением интеркалирующего красителя и снижением уровня флуоресценции. Процесс измене-

ния уровня флуоресценции в зависимости от температуры отслеживается с помощью специального программного обеспечения и преобразует полученные данные в виде графика кривой плавления. При изменениях в структуре ДНК кривая плавления меняется. Эта разница может быть очень небольшой, в доли градуса, однако даже с помощью этой разницы можно выявлять однонуклеотидные замены (SNP), маленькие ин-

серции, делеции и метилирование ДНК.

Эффективность HRM-анализа в сравнении с ПЦР-ПДРФ методом для определения полиморфизма *ESR1-PvuII*: высокая чувствительность, низкий риск контаминации (ПЦР и плавление продукта амплификации проводится в 1 закрытой пробирке), воспроизводимые и точные результаты, быстрый по времени (исключается этап электрофореза), недорогой по стоимости.

Заключение

Технология HRM-анализа характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, является быстрой по времени и недорогой по стоимости, что позволяет использовать ее как экспресс-метод для выявления полиморфизма *ESR1-PvuII* для массового скрининга животных в селекционно-племенной работе в свиноводстве.

Развитие молекулярно-генетических исследований и ДНК-технологий позволяет выявлять предпочтительные аллели и генотипы, что даст возможность прогнозировать развитие хозяйственно полезных признаков у животных для быстрого введения в популяцию особей желаемого генотипа с целью повышения рентабельности производства свинины.

Список использованных источников

1. Эрнст, Л.К. Биотехнология в животноводстве / Л.К. Эрнст, Н.А. Зиновьева. – М.: ВИЖ, 2008. – 510 с.
2. Terman, A. Estrogen receptor gene (*ESR*) and semen characteristics of boars / A. Terman, M. Kmiec, D. Polasik // Arch. Tierz., Dummerstorf. – № 49. – 2006. – С. 71–76.
3. Сметник, А.А. Эстрогеновые рецепторы и их функции (обзор литературы) / А.А. Сметник // Проблемы репродукции. – № 3. – 2011. – С 31–37.
4. Association with litter size of new polymorphisms on *ESR1* and *ESR2* genes in a Chinese-European pig line / G. Munoz [et al.] // Genet. Sel. – Vol. 39. – 2007. – С. 195–206.
5. Зиновьева, Н.А. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н.А. Зиновьева, Е.А. Гладырь, Л.К. Эрнст, Г. Брем // ВИЖ. – 2002. – С. 68–70.
6. Шейко, И.П. Селекция на повышение многоплодия свиноматок крупной белой породы методом молекулярной генной диагностики / И.П. Шейко, Н.А. Лобан, О.Я. Василюк, Д.С. Драбинович // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – № 3. – 2006. – С. 77–81.
7. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines / T.H. Short [et al.] // Journal Animal Science. – № 75. – 1997. – С. 3138–3142.

Дата поступления статьи 2 мая 2014 г.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ-БЕТА В ЛИНИЯХ КУР УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Институт животноводства НААН Украины

Украина, 62404, Харьковская обл., Харьковский р-н, пгт. Кулинич, ул. 7-ой Гвардейской армии, 3

Введение

Семейство трансформирующих ростовых факторов-бета (*TGF-β*) относится к одной из наиболее важных групп генов, принимающих участие в регуляции основных физиологических функций организма [1]. Биологические функции кодируемых данными генами белков у птиц схожи с таковыми у млекопитающих [2]. Члены семейства *TGF-β* относятся к мультифункциональным сигнальным протеинам, играющим важную роль в поддержании тканевого гомеостаза, роста и дифференцировки различных типов клеток, формировании межклеточного матрикса, являются индукторами апоптоза, участвуют в регуляции иммунной системы и т.д. Обладают как паракриной, так и аутокринной активностью. Несмотря на наличие различных типов трансформирующих факторов роста β (*TGF-β1*, *TGF-β2* и *TGF-β3*), механизм их действия (сигнальный каскад) во многом совпадает [3].

Долгое время считалось, что в отличие от млекопитающих, у птиц имеется 4 изоформы трансформирующих ростовых факторов-бета – *TGF-β1*, *TGF-β2*, *TGF-β3* и *TGF-β4* [4, 5, 6]. Однако в работе Halper J. с соавторами показано, что аминокислотные последовательности *TGF-β4* птиц и *TGF-β1* млекопитающих совпадают на 82 %. При этом *TGF-β1* как таковой у птиц не идентифицирован. Более того, функциональная активность *TGF-β4* у птиц подобна *TGF-β1* у млекопитающих. Вследствие чего авторы делают вывод, что *TGF-β4* птиц является ортологом человеческого *TGF-β1*. Таким образом, эволюционно существуют только три изоформы *TGFβ*

как у млекопитающих, так и у птиц, *TGF-β4* как таковой не существует и является ничем иным как *TGF-β1* [7]. Однако, несмотря на это, до сих пор в некоторых публикациях указывают наличие четырех изоформ *TGF-β* у птиц [8].

Каждый из членов семейства *TGF-β* кодируется отдельным геном. Так ген *TGF-β1* локализован в 13 хромосоме, содержит в своем составе 17 экзонов; *TGF-β2* локализован в 3-й хромосоме, содержит 7 экзонов; *TGF-β3* – в 5-й хромосоме и содержит 6 экзонов.

Показана связь различных аллельных вариантов генов семейства *TGF-β* с продуктивными признаками кур, что делает семейство *TGF-β* перспективным для проведения направленной селекции. Так, например, полиморфизм гена *TGF-β3* ассоциирован с показателями живой массы, прироста и т.д. Показано, что генотип ВВ положительно коррелирует с повышенной массой тела на 6 и 8 неделе у мясных кур [9]. В свою очередь, аллельные варианты *TGF-β1* коррелируют с массой селезенки, размером берцовой кости и т.д. [4].

Также показана связь аллельных вариантов *TGF-β2* и *TGF-β3* с устойчивостью кур к сальмонеллезу, что предположительно связано с участием *TGF-β* в регуляции функций иммунной системы [10].

Исходя из вышеизложенного, цель настоящей работы – изучение полиморфизма генов семейства трансформирующих ростовых факторов-бета в популяциях кур украинской селекции различных направлений продуктивности.

Материалы и методы

Исследования проводили в лаборатории профилактики заболеваний птицы и молекулярной диагностики отдела птицеводства Института животноводства Национальной академии аграрных наук Украины.

Для проведения исследований была использована птица отечественной селекции – куры мясо-яичные породы белый плимутрок линия Г-2 (n = 100), куры яичные породы борковская барвистая линия А (n = 100), куры яично-

мясные породы полтавская глинистая линия 14 ($n = 99$). От каждой особи был отобран биологический материал (кровь) на экспериментальной птицеферме «Сохранение государственного генофонда Института животноводства Национальной академии аграрных наук Украины».

Кровь отбирали из гребня с помощью скарификатора на стерильную фильтровальную бумагу. Каждый образец подсушивали, маркировали и индивидуально упаковывали для предотвращения контаминации. Выделение ДНК из опытных образцов проводили с помощью коммерческого набора реагентов «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия). Эффективность выделения ДНК определяли с помощью электрофореза в 0,7%-ном агарозном геле при 200 В в течение 5 мин.

Для проведения амплификации использовали следующие праймеры:

TGF-β1 – F:5'-GGGGTCTTCAAGCTGAGC GT-3' и R:5'-TTGGCAATGCTCTGCATGTC-3';

TGF-β2 – F:5'-GCCATAGGTTTCAGTGCA AG-3' и R:5'-TGACAGAAGCTCTCAAGCC-3';

TGF-β3 – F:5'-TCAGGGCAGGTAGAGGGT GT-3' и R:5'-GCCACTGGCAGGATTCTCAC-3' [4].

Амплификацию проводили с использованием реагентов DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific) с использованием программируемого термоциклера «Терцик» (ДНК-технология, Россия) по соответствующим программам: 1 цикл – денатурация 94 °C 3 мин; 35 циклов – денатурация 94 °C 1 мин, отжиг 1 мин (65 °C для *TGF-β1*; 52 °C для *TGF-β2*; 64 °C для *TGF-β3*), элонгация 72 °C 1 мин; 1 цикл – финальная элонгация 72 °C 10 мин. Объем конечной смеси составил 20 мкл, концентрация праймеров – 0,2 мкмоль в каждом случае.

Обработку амплифицированных фрагментов проводили эндонуклеазами рестрикции *MboII*, *RsaI* и *BsII* согласно стандартным методикам производителя (Thermo Scientific). Продукты рестрикции разделяли в 1,5%-ном агарозном геле при напряжении 150 В в течение 40 мин и в 6%-ном полиакриламидном геле при на-

пряжении 250 В в течение 180 мин. Визуализацию проводили с использованием бромистого этидия в ультрафиолетовом спектре. При использовании полиакриламидного геля проводили окрашивание серебром. Размер рестрикционных фрагментов определяли с использованием маркера молекулярных масс М-50 (Изоген, Россия).

Генотипирование по каждому из локусов проводили посредством анализа полученных электрофореграмм.

Ген *TGF-β1* (трансверсия C/A в положении 632 – миссенс-мутация, приводящая к замене *Glu/Asp* в кодируемом белке) – размер амплифицированного фрагмента 240 п.н. Генотип В/В представлен на электрофореграмме в виде фрагментов ДНК размером 173 и 67 п.н.; F/F – 240 п.н.; В/F – 240, 173 и 67 п.н. соответственно.

Ген *TGF-β2* (транзиция T/C в положении -640) – размер амплифицированного фрагмента 284 п.н. Аллель В в гомозиготном состоянии представлен на электрофореграмме в виде фрагментов ДНК размером 100 и 184 п.н.; аллель L в гомозиготном состоянии – 284 п.н.; гетерозиготы В/L – 100, 184 и 284 п.н.

Ген *TGF-β3* (трансверсия C/A в положении 2833, четвертый интрон) – размер амплифицированного фрагмента 294 п.н. Генотип В/В представлен на электрофореграмме в виде фрагментов ДНК размером 125, 75, 74 и 20 п.н.; L/L – 145, 75 и 74 п.н.; В/L – 145, 125, 75, 74 и 20 п.н. соответственно [4].

Частоту аллелей полиморфных локусов определяли по формулам максимального правдоподобия [11]. На основе полученных данных рассчитывали фактическое и теоретическое распределение генотипов, соответствие генетическому равновесию популяции по Харди-Вайнбергу методом χ^2 , фактическую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготность, коэффициент гомозиготности (C_a), эффективное число аллелей (n_e), индекс фиксации Райта (F_{is}) – по общепринятым методикам с использованием компьютерной программы Popgen32.

Результаты и обсуждение

Использование рестрикционного анализа позволило выявить вариабельность каждого из генов, составляющих семейство *TGF-β* (*TGF-β1*, *TGF-β2* и *TGF-β3*) в изученных популяциях

кур. Аллельные варианты гена *TGF-β1*, возникающие в результате *MboII*-полиморфизма экзонного участка, представлены на электрофореграмме продуктов рестрикции (рис. 1).

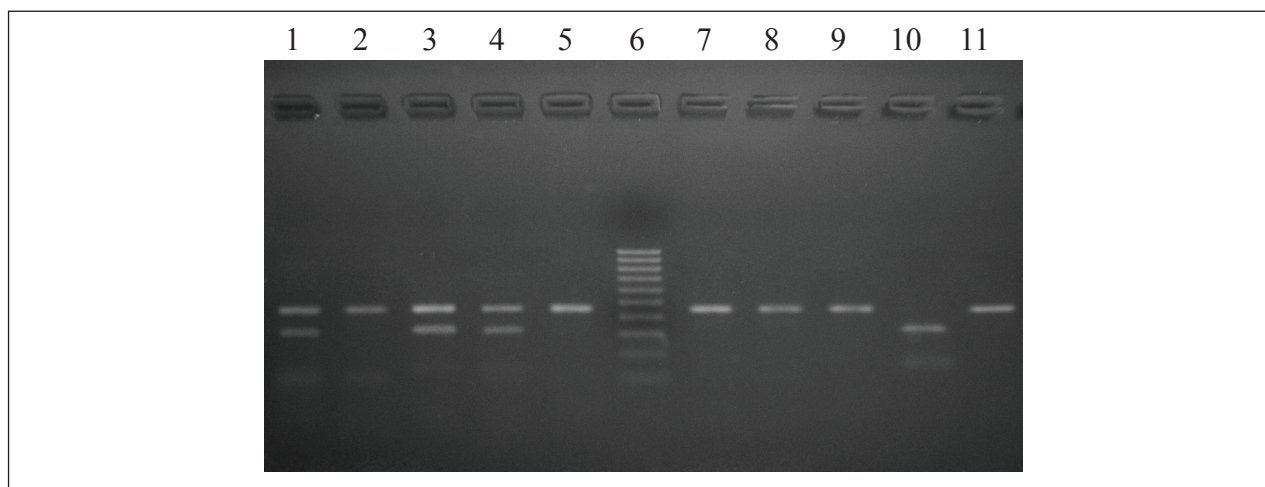


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции экзонного участка гена *TGF-β1*
Дорожки 1, 3, 4 – генотип В/Е; 2, 5, 7, 8, 9, 11 – генотип F/F; 10 – генотип В/В;
6 – маркер молекулярных масс М-50.

Как следует из результатов исследований, ген *TGF-β1* является полиморфным во всех изученных линиях кур. В каждой исследованной популяции присутствуют особи всех возможных генотипов (В/В, В/Е, F/F)

(рис. 1).

Генетическая структура популяций кур мясо-яичного, яичного и яично-мясного направлений продуктивности по локусу *TGF-β1* представлена в табл. 1.

Таблица 1

Генетическая структура популяций кур разного направления продуктивности по локусу *TGF-β1* (экзон, *MboII*)

Генотипы	Белый плимутрок			Борковская барвистая			Полтавская глинистая		
	О	Е	χ^2	О	Е	χ^2	О	Е	χ^2
В/В	6	4,41	0,91	28	29,16	0,22	10	9,51	0,028
В/Е	30	33,18		52	49,68		42	42,35	
Е/Е	64	62,41		20	21,16		47	47,14	
Аллели	Частоты аллелей								
В	0,21			0,54			0,31		
Е	0,79			0,46			0,69		

Примечание: О – фактически выявленное количество особей данного генотипа; Е – теоретически ожидаемое количество особей данного генотипа.

Если рассматривать соотношение частот аллелей *TGF-β1*, то популяции кур мясо-яичного и яично-мясного направлений продуктивности достоверно различаются между собой ($p < 0,05$) и при этом значительно отличаются от яичных кур ($p < 0,001$).

Популяции кур породы белый плимутрок и полтавская глинистая характеризуются преобладанием количества особей с генотипом F/F, в то время как в популяции кур породы борковская барвистая данной закономерности не наблюдает-

ся (табл. 1). Все изученные линии кур находятся в состоянии генетического равновесия.

На рис. 2 представлена электрофореграмма продуктов рестрикции (*RsaI*) промоторного участка гена *TGF-β2*.

Ген *TGF-β2* также является полиморфным. Во всех изученных линиях кур разного направления продуктивности присутствуют все три возможных генотипа (В/В, В/Л и Л/Л). Генетическая структура изученных популяций кур представлена в табл. 2.

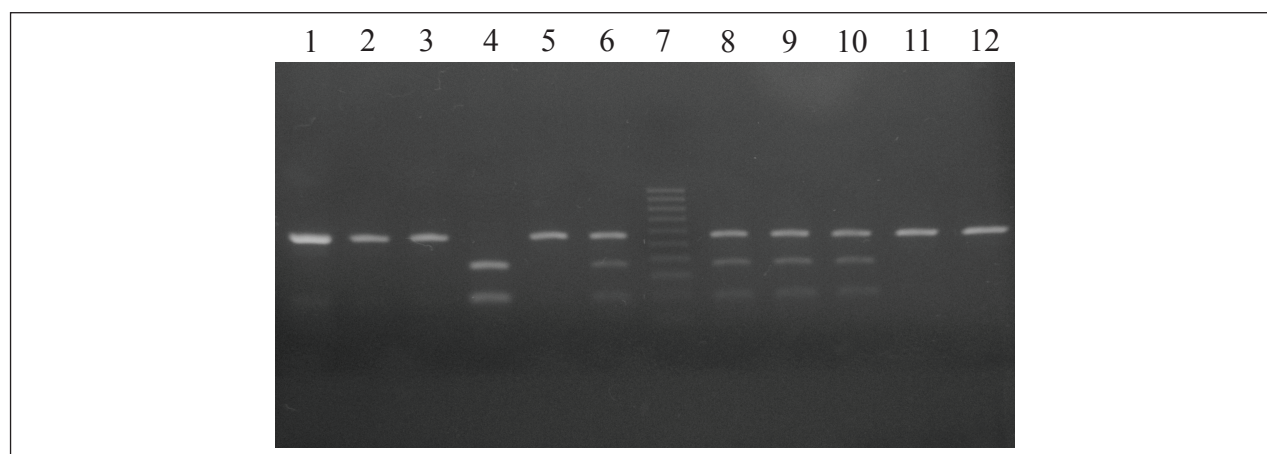


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов рестрикции промоторного участка гена *TGF-β2*
Дорожки 1, 2, 3, 5, 11, 12 – генотип L/L; 4 – генотип B/B; 6, 8, 9, 10 – генотип B/L;
7 – маркер молекулярных масс М-50.

Таблица 2

Генетическая структура линий кур разного направления продуктивности по локусу *TGF-β2* (промоторный участок, *RsaI*)

Генотипы	Белый плимутрок			Борковская барвистая			Полтавская глинистая		
	О	Е	χ^2	О	Е	χ^2	О	Е	χ^2
В/В	24	21,16	1,31	45	42,9	0,86	64	61,79	2,37
В/Л	44	49,68		41	45,2		28	32,84	
Л/Л	32	29,16		14	11,9		7	4,37	
Аллели	Частоты аллелей								
В	0,46			0,65			0,79		
Л	0,54			0,35			0,21		

Наибольшее количество гомозиготных по аллелю В особей наблюдается в линиях кур яично-мясного и яичного направлений продуктивности, наименьшее – в популяции мясо-яичных кур. Все три популяции находятся в состоянии генетического равновесия.

По соотношению частот аллелей изученные популяции кур существенно различаются ($p < 0,001$). Так для линии кур породы полтавская глинистая характерна высокая частота аллеля В (относительно частоты аллеля Л), в тоже время как в линии кур породы белый плимутрок частоты аллелей В и Л различаются не столь выражено (0,46 vs. 0,54). Популяция кур породы борковская барвистая занимает своего рода промежуточное положение.

На рис. 3 представлена электрофореграмма продуктов рестрикции (*BslI*) 4 интрона гена *TGF-β3*.

В изученных популяциях кур ген *TGF-β3* также является полиморфным. В наличии особи

всех трех возможных генотипов (В/В, В/Л и Л/Л).

Следует отметить, что в данном случае для электрофоретического разделения рестриционных фрагментов использовали 8%-ный полиакриламидный гель с последующей окраской серебром. Высокая разрешающая способность данного геля, в отличие от агарозного, позволила разделить фрагменты размером 75 и 74 п.н. При этом следует отметить, что в работах других авторов представлены данные о размерах промежуточных фрагментов, равных по молекулярной массе друг другу (75 п.н.) [9]. По всей видимости, это связано с использованием в цитируемой работе агарозного геля, разрешающей способности которого недостаточно для разделения близких по размерам фрагментов (на электрофореграмме фрагменты, разница в длине которых колеблется в пределах до 15 п.н. будут представлены в виде одной полосы). Данный факт указывает на необходимость использова-

ния полиакриламидных гелей для разделения близких по молекулярным массам фрагментов.

Генетическая структура популяций кур изученных пород представлена в табл. 3.

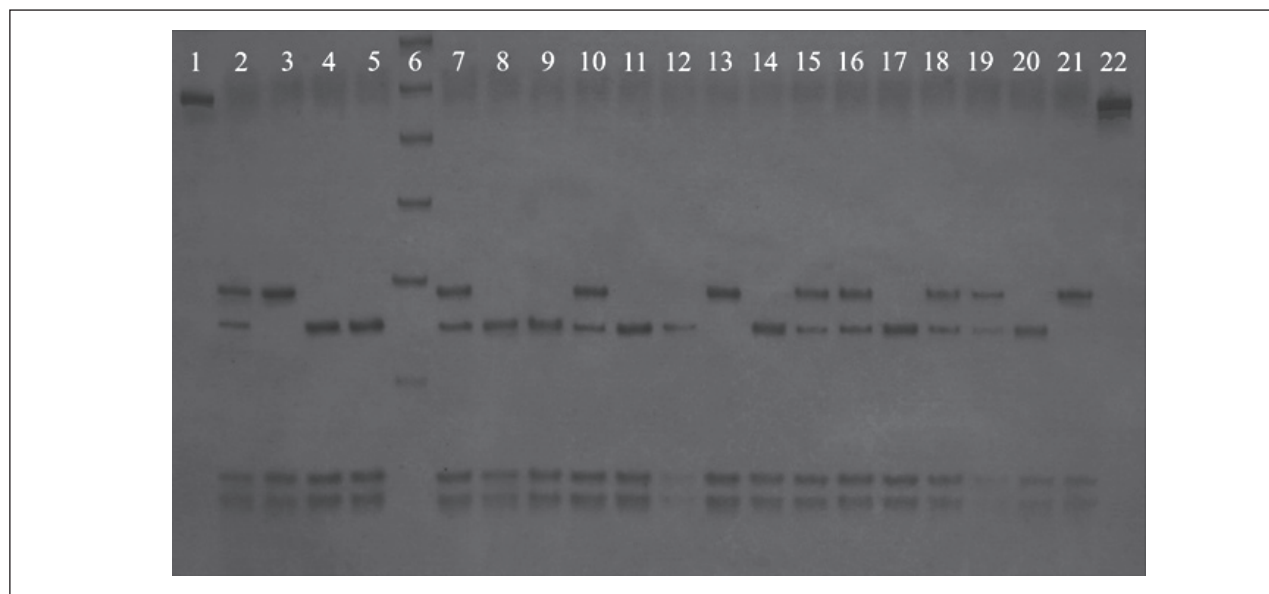


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов рестрикции фрагмента четвертого интрона гена *TGF-β3*. Дорожки 1, 22 – исходный амплифицированный фрагмент; 2, 7, 10, 15, 16, 18, 19 – генотип В/Л; 3, 13, 21 – генотип Л/Л; 4, 5, 8, 9, 11, 12, 14, 17, 20 – генотип В/В; 6 – маркер молекулярных масс М-50.

Таблица 3

Генетическая структура линий кур разного направления продуктивности по локусу *TGF-β3* (четвертый интрон, *BslII*)

Генотипы	Белый плимутрок			Борковская барвистая			Полтавская глинистая		
	О	Е	χ^2	О	Е	χ^2	О	Е	χ^2
В/В	8	5,76	1,73	8	5,29	2,32	34	26,77	8,41
В/Л	32	36,48		30	35,42		35	49,42	
Л/Л	60	57,76		62	59,29		30	22,81	
Аллели	Частоты аллелей								
В	0,24			0,23			0,52		
Л	0,76			0,77			0,48		

Стоит отметить, что популяции кур мясо-яичного и яичного направлений продуктивности по соотношению частот генотипов *TGF-β3* практически идентичны. В то же время для популяции кур яично-мясного направления продуктивности характерна вдвое меньшая частота генотипа Л/Л и вчетверо большая частота встречаемости особей генотипа В/В (табл. 3). При этом в популяции кур породы полтавская глинистая отмечено нарушение генетического равновесия, что предположительно может быть связано с давлением отбора.

По соотношению частот аллелей популя-

ции кур мясо-яичного и яичного направлений продуктивности практически одинаковы (достоверных отличий не обнаружено) и характеризуются значительным превалированием частоты аллеля Л. В свою очередь, популяция кур породы полтавская глинистая достоверно отличается от других изученных линий ($p < 0,001$), при этом частоты аллелей В и Л практически совпадают (0,52 vs. 0,48).

В табл. 4 представлены данные о генетической изменчивости популяций кур изученных пород по генам семейства *TGF-β*.

Таблица 4

Генетическая изменчивость популяций по генам семейства *TGF-β*

Порода	Локус	n	Ca	п _e	Ho	He	Fis
Белый плимутрок	TGF-β1	100	0,668	1,5	0,3	0,332	0,096
	TGF-β2		0,503	1,99	0,44	0,497	0,115
	TGF-β3		0,635	1,57	0,32	0,365	0,123
Борковская барвистая	TGF-β1	100	0,503	1,98	0,52	0,497	-0,046
	TGF-β2		0,545	1,83	0,41	0,455	0,099
	TGF-β3		0,646	1,55	0,3	0,354	0,153
Полтавская глинистая	TGF-β1	99	0,572	1,75	0,424	0,428	0,01
	TGF-β2		0,668	1,5	0,283	0,332	0,148
	TGF-β3		0,501	1,99	0,353	0,499	0,293

Значения фактической гетерозиготности по разным генам семейства *TGF-β* в популяциях кур различных пород находились в пределах от 0,283 до 0,52; в то время как значения ожидаемой гетерозиготности составили от 0,332 до 0,499.

По локусу *TGF-β3* в популяции кур породы полтавская глинистая показано снижение фактической гетерозиготности (0,353) относительно ожидаемой (0,499), что привело к отклонению от состояния генетического равновесия по Харди-Вайнбергу ($\chi^2 = 8,41$; табл. 3).

Уровень средней фактической гетерозиготности по всем изученным генам в популяциях кур пород белый плимутрок и полтавская глинистая практически совпадает и равен 0,35; уровень средней ожидаемой гетерозиготности – 0,39 и 0,42. Тот же показатель в популяции кур породы борковская барвистая составил

0,41 и 0,43 соответственно.

Во всех изученных популяциях кур наименьшее значение индекса фиксации Райта (Fis), как показателя инбридинга особи относительно популяции, составило -0,046 по *TGF-β1* у кур породы борковская барвистая, наибольшее – 0,293 по *TGF-β3* у кур породы полтавская глинистая. Расчет индекса фиксации показал, что в целом во всех изученных популяциях по локусам *TGF-β2* и *TGF-β3* имеется дефицит гетерозиготных генотипов, наиболее выраженный в популяции кур породы полтавская глинистая.

Значение эффективного числа аллелей колебалось в пределах от 1,5 до 1,99 (табл. 4). Наибольшее генетическое разнообразие по генам семейства *TGF-β* характерно для популяции кур породы борковская барвистая, наименьшее – белый плимутрок.

Заключение

Таким образом, впервые изучена генетическая структура популяций кур украинских пород мясо-яичного, яичного и яично-мясного направлений продуктивности по генам семейства трансформирующих ростовых факторов-бета. Все изученные популяции демонстрируют изменчивость по каждому из составляющих генного семейства *TGF-β*. В линии кур породы полтавская глинистая по локусу *TGF-β3* наблюдается смещение генетического равновесия, что может

быть связано с давлением отбора. По остальным генам семейства *TGF-β* во всех изученных линиях кур нарушения генетического равновесия не наблюдается. Наличие в каждой популяции особей всех возможных генотипов (по каждому из локусов) дает возможность проведения в дальнейшей работе серии направленных скрещиваний с целью изучения связи аллельных вариантов соответствующих генов с продуктивными признаками кур украинской селекции.

Список использованных источников

1. Kim, I. Transforming growth factor-β: biology and clinical relevance / I. Kim, M. Kim, S. Kim // Journal of biochemistry and molecular biology. – 2005. – Vol. 38 (1). – P. 1–8.
2. Transforming growth factor-β: its role in ovarian follicle development / D. Rosairo [et al.] // Reproduction. – 2008. – Vol. 136. – P. 799–809.

3. Massague, J. TGF- β signal transduction / J. Massague // Annu. Rev. Biochem. – 1998. – Vol. 67. – P. 753 – 791.
4. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with transforming growth factor- β genes / H. Li [et al.] // Poultry science. – 2003. – Vol. 82. – P. 347–356.
5. Genetics of TGF- β 3 gene polymorphism in inbred synthetic white leghorn breed of poultry / A. Ghosh [et al.] // Journal of evolutionary biology research. – 2011. – Vol. 3 (2). – P. 19–21.
6. Jakowlew, S. Transforming growth factor- β isoforms in the developing chicken intestine and spleen: increase in transforming growth factor- β 4 with coccidian infection / S. Jakowlew, A. Mathias, H.S. Lillehoj // Vet Immunol Immunopathol. – 1997. – Vol. 55 (4). – P. 321–339.
7. Halper, J. On reassessment of the chicken TGF β 4 gene as TGF β 1 / J. Halper, D. Burt, M. Romanov // Growth factors. – 2004. – Vol. 22. – P. 121–122.
8. Mohammad, C. Novel single nucleotide polymorphism in intron 4 of TGF- β 3 gene and its association with production trait in Isfahan native fowl / C. Mohammad, F. Mostafa // Annals of biological research. – 2013. – Vol. 4 (2). – P. 64–68.
9. Enayati, B. Genomic growth hormone, growth hormone receptor and transforming growth factor β -3 gene polymorphism in breeder hens of Mazandaran native fowls / B. Enayati, G. Rahimi-Mianji // African Journal of biotechnology. – 2009. – Vol. 8 (14). – P. 3154–3159.
10. Malek, M. Association of *INOS*, *TRAIL*, *TGF- β 2*, *TGF- β 3*, and *Igf* genes with response to *Salmonella enteritidis* in poultry / M. Malek, S.J. Lamont // Genet. Sel. Evol. – 2003. – Vol. 35. – P. 99–111.
11. Меркурьева, Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве / Е.К. Меркурьева. – М.: Колос, 1977. – 240 с.

Дата поступления статьи 22 октября 2013 г.

НЕКОТОРЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ДЕТЕКЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072 г. Минск, Академическая, 27

Введение

Учитывая право потребителей на получение информации о продуктах питания, в том числе информации о том, что продукт является генетически модифицированным или содержит генетически модифицированные составляющие (далее – ГМС), во многих странах принята система маркировки таких продуктов. В частности, в Беларуси настоящая норма закреплена в Законе «О качестве и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов для жизни и здоровья человека» [1] и Законе «О защите прав потребителей» [2]. В соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь № 116 от 2 сентября 2003 г. [3], с 1 января 2004 г. введена обязательная государственная гигиеническая регламентация и регистрация продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также компонентов (фрагментов) для их производства, полученных из генетически модифицированных источников или с их использованием. В ходе процедуры гигиенической регистрации ряд видов пищевого сырья и продуктов питания, имеющих генетически модифицированные аналоги (далее ГМ-аналоги), подлежит обязательному лабораторному исследованию на наличие генетически модифицированных составляющих.

Постановлением Совета Министров Республики Беларусь № 434 от 28 апреля 2005 г. [4] предусмотрено создание и аккредитация лабораторий на проведение таких исследований. Установлено, что маркировке подлежат продукты и сырье, содержащие даже следовые концентрации ГМС, а продукты детского питания вообще не должны их содержать. Поскольку маркировка не затрагивает безопасность населения, лабораторным исследованиям подвергают не все продукты, имеющие ГМ-аналоги, а только те, что с наиболее высокой вероятностью могут содержать

ГМ-компоненты. В связи с этим утвержден перечень сырья и продуктов для контроля за наличием ГМС [5], в который были включены продукты и сырье, произведенные из сои и кукурузы. Выбор продуктов для лабораторных исследований определен на основании анализа посевных площадей, занятых в мире под трансгенными культурами, а также по результатам мониторинговых исследований продуктов, представленных на рынке Беларуси.

Ограничение круга продуктов, подлежащих обязательным лабораторным исследованиям, наличие большого количества аккредитованных лабораторий (в 2013 г. в нашей стране их было 18), применение методов детекции ГМС, доступных по стоимости для большинства поставщиков продукции, сделало возможным проведение массовых анализов и тотального контроля за оборотом ГМ-продуктов. Это позволяет избежать возможных нарушений законодательства Республики Беларусь в данной сфере, повышает доверие потребителей к результатам функционирования системы маркировки ГМ-продуктов.

В связи с образованием Таможенного союза ЕврАзЭС рассматривается вопрос о переходе Беларуси на систему маркировки ГМ-продуктов, принятую в Российской Федерации (аналогичной той, что применяется в Европейском Союзе). Законодательство Европейского Союза и Российской Федерации в области маркировки ГМ-продуктов имеет ряд отличий от соответствующего законодательства Республики Беларусь. В частности, в Европейском Союзе и Российской Федерации существует система «помещения на рынок» (государственной регистрации, допуска к использованию) трансгенных событий (линий) ГМ-растений не только для выращивания с целью производства продукции, но и для использования в качестве продуктов питания, кормов и для переработки

(это касается, прежде всего, импортируемой продукции). Законодательством установлен минимальный порог 0,9% на присутствие в сырье, продуктах и кормах биологического материала зарегистрированных трансгенных линий относительно немодифицированных аналогов традиционной селекции, превышение которого требует обязательной маркировки соответствующих продуктов, сырья и кормов. Введение названного порога объясняют тем, что технически во многих случаях сложно избежать случайного занесения ГМ-примесей в готовую продукцию (контаминации). Наличие описанной системы регистрации трансгенных линий (для употребле-

ния и переработки) и порогового уровня предполагает не только детекцию определенных регуляторных элементов, характерных для ДНК большинства ГМО (как это делается в Беларуси), а идентификацию конкретных трансгенных линий и количественное определение их относительного содержания в продукте.

Целью настоящей статьи является рассмотрение ряда методических аспектов проведения исследований по детекции и количественному определению ГМС в соответствии законодательством Российской Федерации, которые необходимо учитывать при рассмотрении вопроса о введении аналогичных норм в Республике Беларусь.

Материалы и методы

Материалом исследования служили данные международной базы [6] о наличии генетических элементов, широко используемых при создании генетически модифицированных организмов (далее – ГМО): 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (далее – 35S-промотора), терминальной последовательности NOS агробактерий

A. tumefaciens, маркерного гена *npt II* транспозона *Tn 5 E. coli*, маркерного гена *gus E. coli* и промотора или терминатора гена *ocs A. tumefaciens* у зарегистрированных (допущенных к использованию в хозяйственной деятельности) трансгенных линий сои и кукурузы. Также анализировали данные о количестве копий 35S-промотора у этих линий.

Результаты и обсуждение

Выбор праймеров для детекции ГМС при проведении скрининговых исследований

В соответствии с методическими рекомендациями МУК 4.2 2304-07 (приложение к Постановлению Главного государственного санитарного врача РФ № 80 от 30 ноября 2007 г.) [7], при проведении скрининговых исследований рекомендуется использовать праймеры к генетическим элементам, широко используемым при создании ГМО: к 35S-промотору,

к терминальной последовательности NOS, маркерному гену *npt II*. В случае применения в скрининговых исследованиях биочипов помимо названных генетических элементов также выявляют маркерный ген *gus* и промотор гена *ocs*.

В таблице представлены данные по наличию в разрешенных к использованию трансгенных линиях сои названных последовательностей ДНК (по данным [6]).

Таблица

Наличие используемых при создании ГМО регуляторных последовательностей у допущенных к использованию в хозяйственной деятельности трансгенных событий (линий) сои (по [6])

Фенотипический признак	Трансгенное событие (линия)	Промотор 35S	Терминатор NOS	Ген <i>npt II</i>	Ген <i>gus</i>	Промотор/терминатор <i>ocs</i>
Толерантность к гербициду глифосату	GTS40-3-2	+	+	–	–	–
	MON 89788	–	–	–	–	–
Толерантность к фосфинотрициновым гербицидам (глюфофизинату аммония)	A2704-12	+	–	–	–	–
	A2704-21	+	–	–	–	–
	A5547-35	+	–	–	–	–
	A5547-127	+	–	–	–	–
	GU262	+	–	–	–	–
	W62	+	–	–	+	–
	W98	+	–	–	+	–

Продолжение таблицы

Фенотипический признак	Трансгенное событие (линия)	Промотор 35S	Терминатор NOS	Ген <i>npt II</i>	Ген <i>gus</i>	Промотор/терминатор <i>ocs</i>
Толерантность к гербициду имидозолинону	BPS-CV 127-9	—	—	—	—	—
Толерантность к глифосату и ALS-ингибирующим гербицидам (имидозолинону и др.)	DP356043	—	—	—	—	—
Устойчивость к насекомым-вредителям	MON 87701	—	—	—	—	—
Устойчивость к насекомым-вредителям и толерантность к гербициду глифосату	MON 87701× MON 89788	—	—	—	—	—
Модификация содержания жирных кислот в семенах, особенно высокая экспрессия олеиновой кислоты	G94-1 G94-19 G168 DP 305423	+ + + —	+ + + —	— — — —	+ + + —	— — — —

По состоянию на 1 сентября 2013 г. официально допущены к использованию 17 трансгенных событий (линий) сои. Из них 11 содержат 35S-промотор. Следовательно, ГМС, происходящие из этих линий могут быть обнаружены в образцах с помощью тест-систем, позволяющих выявлять повторности этого генетического элемента. Другие регуляторные элементы и гены, которые рекомендуют детектировать для обнаружения ГМС в проанализированных трансгенных линиях сои, за небольшим исключением, не представлены. Использование праймеров для обнаружения этих последовательностей ДНК при детекции ГМС из сои является излишним. Не содержат 35S-промотор несколько трансгенных линий сои, зарегистрированных сравнительно недавно (2007–2011 гг.): MON89788, MON87701, гибрид между ними, DP356043, DP305423, BPS-CV127-9. Для этих линий характерно использование исключительно растительных регуляторных элементов, поэтому ГМС, происходящие из них, не могут быть выявлены с помощью обычно применяемых тест-систем, которые позволяют обнаружить последовательности 35S-промотора. Следовательно, для детекции ГМС, происходящих из этих линий, необходимо использовать тест-системы, содержащие праймеры к специфичным для этих линий последовательностям ДНК.

Необходимо иметь в виду, что в ГМ-продукции, поступающей в Республику Беларусь, доминирует ГМС, происходящие из линии трансгенной сои GTS 40-3-2, а вероятность появления на рынке Беларуси названных выше линий незначительна. В связи с этим методы детекции ГМС из трансгенной сои, основанные на выявлении в анализируемых образцах последовательностей ДНК 35S-промотора, позволяют охватить практически всю ГМ-продукцию, поступающую на рынок Беларуси. Ситуация может измениться, когда эти линии будут зарегистрированы в Европейском Союзе и Российской Федерации.

Аналогичный вывод вытекает из результатов анализа допущенных к использованию трансгенных линий кукурузы (таблица из-за громоздкости не приводится). По состоянию на 1 сентября 2013 г. официально допущены к использованию 54 трансгенных событий (линий) кукурузы, в том числе 25 половых гибридов между различными ГМ-линиями [7]. Из них 48 (89%) содержат 35S-промотор. Не содержат 35S-промотор линии GA21, MIR604, LY038, 3272, Event 98140 и гибрид MIR604×GA21. Линии GA21, MIR604 и 3272 содержат терминатор NOS. Все эти линии, за исключением GA21, зарегистрированы сравнительно недавно и их появление на рынке Беларуси в ближайшее время маловероятно.

Следует также иметь в виду, что высоколизиновая линия LY038 применяется исключительно для производства кормов, а линия 3272 (зарегистрирована в 2008 г.), продуцирующая термостабильную альфа-амилазу, предназначена для производства промышленного спирта (биотоплива).

Проведение исследований по детекции ГМС кукурузы, основанное на выявлении повторностей ДНК 35S-промотора, позволяет обнаружить ГМС, происходящие из 89% зарегистрированных трансгенных линий и гибридов кукурузы. Очевидно, для массовых (скрининговых) анализов продовольственного сырья и пищевых продуктов такой процент является вполне приемлемым.

Для анализа детского питания, содержащего кукурузу, желательно использовать тест-системы, позволяющие выявлять повторности ДНК как 35S-промотора, так и терминатора NOS, что позволит дополнительно обнаружить такие линии и гибриды с их участием, как GA-21, MIR604 и 3272. Поскольку трансгенная линия GA-21 недавно была авторизована для использования в пищу в странах Европейского Союза и в Российской Федерации, это делает вероятным появление на рынке Беларуси продукции, полученной с ее участием. Следует также иметь в виду, что терминатор NOS может присутствовать в анализируемых пробах, например, в зерне кукурузы, в ДНК агробактерий (контаминация), что может привести к появлению ложноположительного результата. В связи с этим для детекции GA-21 целесообразно использовать тест-системы, содержащие праймеры, специфичные для этой линии.

Использование праймеров к 35S-промотору для количественного определения относительного содержания ГМС в продуктах питания.

Методическими рекомендациями МУК 4.2 2304-07 (приложение к Постановлению Главного государственного санитарного врача РФ № 80 от 30 ноября 2007 г.) [6] предусмотрена возможность использования метода ПЦР в реальном времени с праймерами к 35S-промотору для количественного определения ГМС.

Большинство трансгенных линий сои содержит по одной копии 35S-промотора [7]. У шести линий, как отмечалось выше, этого промотора нет. Линия GTS 40-3-2 содержит две копии 35S-промотора (enhanced 35S-promoter). Количество копий 35S-промотора у трансгенных линий кукурузы варьирует в весьма ши-

роких пределах (от одной до шести). В частности, по одной копии 35S-промотора содержат линии B-16, T-14, 176, TC1507, DAS-06275-8, MON88017, DAS-59122-7, 678, 680, MS6, MON87460, по две копии – линии MON 810, MON 863, MON89034, NK603, BT11, 676, три копии – линии MON80100, T25, MS3, четыре копии – линия MON 802, пять копий – линии MON 832, CBH-351, DBT418, шесть копий – линия MON 809. Следует также иметь в виду, что большое количество (25) зарегистрированных трансгенных событий представляют собой полные гибриды между ГМ-линиями. Предсказать какое количество копий содержится у них достаточно сложно, поскольку среди них есть сложные гибриды типа BT11×GA21×MIR162, BT11×MIR162×MIR604, BT11×MIR604×GA21, MON89034×TC1507×MON88017×DAS59122-7, TC1507×MON810×NK603.

Сорта сои, созданные на основе трансгенной линии GTS 40-3-2, в настоящее время доминируют в посевах ГМ-сое. Соответственно, в ГМ-продукции из сои, поступающей на рынок Беларуси, Российской Федерации, других стран, как показывает практика, в основном детектируют именно эту линию. Наибольшую вероятность появления на рынке Беларуси ГМС из кукурузы имеет трансгенная линия кукурузы MON810, поскольку это единственная линия, разрешенная к выращиванию для производства сельхозпродукции в Европейском Союзе. Поэтому не случаен тот факт, что тест-системы для количественного определения содержания ГМС из сои и кукурузы, как правило, предлагают использовать в качестве стандартных образцов референсные материалы этих линий. Однако следует иметь в виду, что если количественное определение ГМС производится по 35S-промотору, то при использовании таких тест-систем для трансгенных линий сои, содержащих одну копию этого регуляторного элемента, получаются результаты, заниженные вдвое. Это же относится к трансгенным линиям кукурузы, содержащих одну копию 35S-промотора, поскольку у MON810 их две. В то же время для линий, содержащих более двух копий этого регуляторного элемента, результаты получаются завышенными. Точное количественное определение ГМС по 35S-промотору возможно только в том случае, если в качестве стандартных образцов используются именно те трансгенные линии, которые мы определяем.

Искажение результатов возможно также в случае, если анализируемая продукция содержит смесь ГМС из разных линий, имеющих разное количество копий 35S-промотора, или смесь трансгенных линий сои и кукурузы. В смеси с помощью такого определения невозможно точно определить, какой из компонентов (соя или кукуруза) являются генетически модифицированным, какой процент ГМ-соя и ГМ-кукурузы содержится в анализируемом образце (если оба компонента ГМ), поскольку и та, и другая содержат детектируемую последовательность 35S-промотора. Более того, полученные цифры будут различаться в зависимости от того, относительно каких стандартных образцов производятся расчеты (либо сои, либо кукурузы). С помощью такого анализа в смеси также невозможно корректно определить, превышает ли выявленное содержание ГМ-компонентов допустимый

уровень. Так, если процент содержания в смеси ГМ-соя составляет 0,7, а ГМ-кукурузы – 0,8, то продукт не подлежит маркировке, поскольку ни один из ГМ-компонентов не превышает допустимый уровень. Однако если оценка будет проводиться по 35S-промотору, этот уровень будет, несомненно, превышен.

Как видно, использование количественного определения ГМС по 35S-промотору не в состоянии удовлетворить в полной мере перечисленные выше требования законодательства ЕС и Российской Федерации. В связи с этим предусмотрена точная идентификация в анализируемой продукции всех содержащихся в ней трансгенных линий и индивидуальное количественное определение содержания каждой из них с использованием в качестве стандартных образцов референсных материалов соответствующей трансгенной линии.

Заключение

1. Анализ наличия у допущенных к использованию трансгенных линий сои и кукурузы генетических элементов, рекомендуемых для выявления при проведении скрининговых исследований, показал, что 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты содержат 11 из 17 линий сои и 48 из 54 линий и гибридов кукурузы. Остальные рекомендуемые генетические элементы (терминатор NOS, маркерные гены *prt II* и ген *gus*, промотор гена *ocs*) представлены лишь у небольшого количества линий. Методы детекции ГМС, основанные на выявлении в анализируемых образцах последовательностей ДНК 35S-промотора, позволяют охватить практически все ГМ-продукты, поступающие

на рынок Беларуси. Дополнительно для детекции ГМ-кукурузы GA-21 целесообразно использовать тест-системы, содержащие праймеры, специфичные для этой линии.

2. Допущенные к использованию трансгенные линии сои и кукурузы содержат различное количество копий 35S-промотора, что может искажать результаты количественного определения ГМС с использованием праймеров к этому генетическому элементу. Искажение результатов возможно также в случае, если анализируемая продукция содержит смесь ГМС из разных линий, имеющих разное количество копий 35S-промотора, или смесь трансгенных линий сои и кукурузы.

Список использованных источников

1. О качестве и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов для жизни и здоровья человека: Закон Респ. Беларусь, 29 июня 2003 г., № 217-3 // Нац. реестр правовых актов Республики Беларусь. – 2003. – №79. – 2/966.
2. О защите прав потребителей: Закон Респ. Беларусь, 9 января 2002 г., № 90-3 // Нац. реестр правовых актов Республики Беларусь. – 2003. – № 8. – 2/932.
3. О государственной гигиенической регламентации и регистрации продовольственного сырья и пищевых продуктов, по-

лученных из или с использованием генетически модифицированных источников: постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь, 2 сентября 2003 г., № 116. // Национальный координационный центр биобезопасности [Электронный ресурс]. – Минск, 2013.

4. О некоторых вопросах информирования потребителей о продовольственном сырье и пищевых продуктах: постановление Совета Министров Республики Беларусь, 28 апреля 2005 г., № 434 // Нац. реестр правовых актов Республики Беларусь. – 2005. – № 72. – 5/15898.

5. Об утверждении перечня продовольственного сырья и пищевых продуктов, подлежащих контролю за наличием генетически модифицированных составляющих (компонентов): постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь и Комитета по стандартизации, метрологии и сертификации при Совете Министров Республики Беларусь, 8 июня 2005 г., № 12/26 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. – 2005 – № 105. – 8/12762.

6. CERA GM Crop Database [Electronic

resource]. – Mode of access: <http://www.cera-gmc.org>. – Date of access: 2.09.2013.

7. МУК 4.22304-07 Методы идентификации и количественного определения генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения (утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30 ноября 2007 г № 80 «О надзоре за оборотом пищевых продуктов, содержащих ГМО») [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.OpenGost.ru>. – Дата доступа: 2.09.2013.

Дата поступления статьи 11 сентября 2013 г.

РЕФЕРАТЫ

SUMMARIES

УДК 577.21:602.6:604.6

Хотылева, Л.В. Научное наследие академика НАН Беларуси Картеля Николая Александровича / Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский, О.Ю. Урбанович // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 7–11.

Статья посвящена памяти выдающегося белорусского ученого академика Картеля Николая Александровича. Отражены основные этапы научной деятельности Н.А. Картеля. Приведены результаты важнейших исследований Н.А. Картеля в области генетической трансформации и молекулярной генетики.

Ключевые слова: академик Картель Н.А., генетическая трансформация, молекулярная генетика.

Khotyleva, L. Scientific Heritage of Nikolai A. Kartel, Academician of the National Academy of Sciences of Belarus / L. Khotyleva, A. Kilcheuski, O. Urbanovich // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 7–11.

The article is dedicated to the memory of the outstanding Belarusian scientist – Academician Nikolai A. Kartel. Basic milestones of N.A. Kartel's scientific activities are presented, with the results of his most important investigations in the field of genetic transformation and molecular genetics being given.

Key words: Academician Kartel N.A., genetic transformation, molecular genetics.

УДК 577.21:575.174.015.3:616.72-002.77

Полиморфные варианты генов *TNFA* -308 G→A, *XPDA* Asp312Asn и *XRCCI* Arg399Gln у детей с ювенильным ревматоидным артритом / О.П. Романюк [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 12–18. – Соавт.: Н.И. Рябоконт, Н.В. Никитченко, Е.В. Сечко, А.М. Чичко, А.В. Сукало, Р.И. Гончарова.

Исследована частота полиморфных вариантов генов *TNFA* -308 G→A, *XPDA* Asp312Asn (934G→A) и *XRCCI* Arg399Gln (1196G→A) у 40 детей с ювенильным ревматоидным артритом (ЮРА) по сравнению с контрольной группой (60 детей). В группе пациентов с ЮРА обнаружено увеличение частоты аллели G дикого типа (OR = 4,74, $p = 0,052$) и генотипа G/G (OR = 5,26, $p = 0,042$) гена *TNFA* -308 по сравнению с контролем. При анализе полиморфизма гена *XPDA* Asp312Asn не выявлено значимых различий между исследуемыми группами детей. Статистически значимое ($p = 0,008$) уменьшение частоты встречаемости гетерозигот у пациентов с ЮРА (27,5%) по сравнению с контрольной группой (55%) обнаружено при изучении распределения генотипов и аллелей гена *XRCCI* Arg399Gln.

Ключевые слова: ювенильный ревматоидный артрит, гены репарации ДНК, фактор некроза опухоли, полиморфизм генов.

TNFA -308 G→A, *XPDA* Asp312Asn and *XRCCI* Arg399Gln gene polymorphisms in children with juvenile rheumatoid arthritis / V. Ramaniuk [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 12–18. – N. Ryabokon, N. Nikitchenko, E. Sechko, A. Chichko, A. Sukalo, R. Goncharova.

TNFA -308 G→A, *XPDA* Asp312Asn (934G→A) and *XRCCI* Arg399Gln (1196G→A) gene polymorphisms were investigated in 40 children with juvenile rheumatoid arthritis (JRA) as compared to the control group (60 children). Increase in the frequency of the wild type G allele (OR = 4.74, $p = 0.052$) and the G/G genotype (OR = 5.26, $p = 0.042$) of *TNFA* -308 gene was found in the group of patients with JRA as compared to the control. No statistical differences were revealed between two groups when analyzing polymorphism of *XPDA* Asp312Asn gene. When studying distribution of genotypes and alleles of *XRCCI* Arg399Gln gene, a significant decrease ($p = 0,008$) in the heterozygote occurrence frequency was revealed in patients with JRA (27.5%) as compared to the control group (55%).

Key words: juvenile rheumatoid arthritis, DNA repair genes, tumor necrosis factor, gene polymorphism.

УДК 616.34-002.1-053.2-06:616.98

Полякова, Н.В. Генотипический пейзаж ротавирусов – этиологических агентов острых гастроэнтеритов у детей в г. Минске в 2012–2013 гг. / Н.В. Полякова, Г.В. Семейко, Е.О. Самойлович // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17 – Минск, 2014. – С. 19–24.

В данном исследовании с помощью полугнездовой мультиплексной ОТ-ПЦР было проведено генотипирование 163 ротавирусов, выявленных в образцах стула детей с подтвержденным в ИФА ротавирусным гастроэнтеритом, госпитализированных в детскую инфекционную клиническую больницу г. Минска в 2012–2013 гг. Полученные данные свидетельствуют о том, что в течение двух лет в г. Минске циркулировали 6 генетических G-P-вариантов ротавируса, более 99% из которых составляли вирусы широко распространенных генотипов: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8]. При этом доминирующим генотипом на протяжении двух лет анализа являлся G4P[8], составивший от $55,4 \pm 6\%$ в 2012 г. до $69,3 \pm 5,5\%$ в 2013 г. и регистрируемый как в сезонный подъем ротавирусной инфекции, так и в межсезонный период. Далее по убывающей следовали комбинации G1P[8] ($12,3 \pm 2,6\%$), G3P[8] ($9,8 \pm 2,3\%$), G2P[4] ($6,7 \pm 1,9\%$), G9P[8] ($6,1 \pm 1,9\%$), G3P[9] ($0,6 \pm 0,5\%$).

Ключевые слова: ротавирус, генотипы, полугнездовая мультиплексная ОТ-ПЦР.

Poliakova, N. Genotypic landscape of rotaviruses – etiological agents of acute gastroenteritis among children in Minsk in 2012–2013 / N. Poliakova, G. Semeiko, E. Samoilovich // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings.* – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 19–24.

In this study, 163 rotaviruses, revealed in stool samples of children with rotavirus gastroenteritis verified in EIA, were genotyped using multiplex RT-PCR. These children were admitted to Minsk Children Infectious Diseases Hospital in 2012–2013. The findings indicate that 6 rotavirus G-P genetic variants have circulated in Minsk within two years, over 99% of which were widespread rotavirus genotypes: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] and G9P[8]. Within two years of analysis the dominant genotype was G4P[8] which amounted to $55.4 \pm 6\%$ in 2012 and $69.3 \pm 5.5\%$ in 2013 and was recorded as a seasonal rise in rotavirus infection and in off-season.

Further downwards followed combinations G1P[8] ($12.3 \pm 2.6\%$), G3P[8] ($9.8 \pm 2.3\%$), G2P[4] ($6.7 \pm 1.9\%$), G9P[8] ($6.1 \pm 1.9\%$), G3P[9] ($0.6 \pm 0.5\%$).

Key words: rotavirus, genotypes, multiplex RT-PCR.

УДК 616.132.2-002-008.6-036.11-036.87:575.174.015.3

Влияние генетических полиморфизмов *ABCB1* и *CYP2C19* на развитие рецидивирующих коронарных событий у пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам / Н.П. Митьковская [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 25–30. – Соавт.: Т.В. Статкевич, С.С. Галицкая, Е.М. Балыш, А.С. Постоялко, Е.С. Смирнова, А.А. Гусина, Е.А. Сулимчик.

Для лечения и вторичной профилактики ишемической болезни сердца применяется препарат клопидогрел. Его клиническая эффективность может снижаться вследствие генетических полиморфизмов изоферментов, участвующих в метаболизме препарата. Наиболее важную роль в метаболизме клопидогрела играет ген *CYP2C19*, характеризующийся значительным генетическим полиморфизмом. Нами была изучена частота встречаемости мутантных аллелей генов *ABCB1* и *CYP2C19* у пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам. В группе пациентов с развитием рецидивирующих коронарных событий в остром периоде инфаркта миокарда частота встречаемости генотипа ТТ гена *ABCB1* составила 6,25%, генотипа СТ гена *ABCB1* – 93,75%, тогда как в группе пациентов с неосложненным течением инфаркта миокарда носителей генотипа ТТ не обнаружено, а удельный вес гетерозигот (генотипа СТ) составил 81,25%. Частота встречаемости генотипа *CYP2C19**2 (*1/*2) у пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, течение которого осложнилось развитием рецидивирующих коронарных событий, и с неосложненным течением заболевания, составила 37,5% и 6,25% соответственно.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, клопидогрел, острый коронарный синдром.

The influence of *ABCB1* and *CYP2C19* genetic polymorphisms on the development of recurrent coronary events in patients with ST-segment elevation acute coronary syndrome who underwent percutaneous coronary interventions / N. Mitkovskaya [et al.] // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings.* – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 25–30. – T. Statkevich, S. Galitskaya, E. Balysh, A. Postoyalko, E. Smirnova, A. Gusina, E. Sulimchik.

Clopidogrel is used for treatment and secondary prevention of ischemic heart disease. Its clinical effectiveness can decrease as a result of genetic polymorphisms of enzymes involved in clopidogrel metabolism. *CYP2C19* plays an important role in clopidogrel metabolism and is characterized by significant genetic polymorphism. We have studied the occurrence frequency of mutant

alleles of *ABCB1* and *CYP2C19* genes in the patients with ST-segment elevation acute coronary syndrome treated with clopidogrel. The occurrence frequency of TT and CT genotypes of *ABCB1* gene in the group of patients with recurrent coronary events in the acute period of myocardial infarction amounted to 6.25% and 93.75% respectively, whereas in patients without complications no TT genotype carriers were revealed and the specific weight of heterozygotes (CT genotype) was 81.25%. The occurrence frequency of *CYP2C19**2 (*1/*2) genotype in patients with ST-segment elevation acute coronary syndrome complicated by development of recurrent coronary events and in patients without complications amounted to 37.5% and 6.25% respectively.

Key words: genetic polymorphism, clopidogrel, acute coronary syndrome.

УДК 616.127-005.8:575.174.015.3:547.313.2

Распространенность полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*C677T*) у пациентов с крупноочаговым инфарктом миокарда и рецидивирующими коронарными событиями / Н.П. Митьковская [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 31–37. – Соавт.: Т.В. Статкевич, Е.М. Балыш, А.А. Гусина, И.В. Патеюк, Л.В. Картун, Е.А. Сулимчик.

Целью работы являлось изучение распространенности полиморфизма *C677T* гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы у пациентов с острым крупноочаговым инфарктом миокарда (ИМ), течение которого осложнилось развитием рецидивирующих коронарных событий (РКС). В исследование были включены 92 пациента в возрасте от 35 до 78 лет с острым крупноочаговым ИМ, получившие в качестве реперфузионной терапии тромболизис. Основную группу составили 45 пациентов, течение заболевания у которых осложнилось развитием РКС. В группу сравнения были включены 47 пациентов с неосложненным течением заболевания. В качестве РКС после проведения реперфузионной терапии рассматривались рецидивирующий ИМ, ранняя постинфарктная стенокардия, ретромбоз инфаркт-связанной артерии. Гомозиготное носительство двух полиморфных аллелей (генотип MTHFR 667 TT) достоверно более часто выявлялось в группе пациентов с крупноочаговым ИМ, осложнившимся развитием РКС, чем у лиц с неосложненным течением заболевания (31,58% и 3,45% соответственно, $\chi^2 = 7,3, p < 0,01$). Уровень гомоцистеинемии у пациентов с РКС был выше, чем в группе сравнения (20 (17,5; 27) и 17,5 (15; 21) мкмоль/л соответственно, $p < 0,05$).

Ключевые слова: генетический полиморфизм, метилентетрагидрофолатредуктаза, крупноочаговый инфаркт миокарда, рецидивирующие коронарные события, гомоцистеинемия.

Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C→T polymorphism in patients with macrofocal myocardial infarction and recurrent coronary events / N. Mitkovskaya [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 31–37. – T. Statkevich, E. Balysh, A. Gusina, I. Pateyuk, L. Kartun, E. Sulimchik.

The aim of this study was to evaluate the frequency of polymorphism *C677T* in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with acute macrofocal myocardial infarction (MI) complicated with development of recurrent coronary events (RCE). This study included 92 patients, aged 35–78, with acute macrofocal MI treated with effective thrombolysis. The main group included 45 patients with acute macrofocal MI complicated with RCE. The comparison group consisted of 47 patients without complications. Recurrent myocardial infarction, early postinfarction angina pectoris and rethrombosis of the infarct-related artery were considered as RCE after reperfusion therapy. Homozygous carriage of two polymorphic alleles (genotype MTHFR 667 TT) was revealed more frequently in patients with macrofocal MI complicated by RCE development as against the comparison group (31.58% vs 3.45% respectively, $\chi^2 = 7.3, p < 0.01$). The level of homocysteinemia in patients with RCE was higher than in the comparison group (20 (17.5; 27) vs 17.5 (15; 21) mmol/l respectively, $p < 0.05$).

Key words: polymorphism, methylenetetrahydrofolate reductase, macrofocal myocardial infarction, recurrent coronary events, homocysteinemia.

УДК [612.44:591.147:591.133.2]:612.017.2

Городецкая, И.В. Влияние тиреоидного статуса на вызванное стрессом изменение экспрессии генов раннего ответа *c-fos* и *c-jun* в миокарде крыс / И.В. Городецкая, О.В. Евдокимова // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 38–47.

В опытах на 78 беспородных белых крысах-самцах показано, что в условиях как физического ($t\ 4-5\ ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин) стресса, сопровождающегося повышением концентрации йодсодержащих тиреоидных гормонов в крови, так и химического (25% раствора этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела) и эмоционального (свободное плавание животных в клетке) воздействий, приводящих к ее снижению, происходит увеличение экспрессии генов раннего ответа *c-fos* и

c-jun в миокарде крыс. Степень возрастания уровней мРНК указанных генов зависит от природы воздействующего фактора. В условиях физического стресса в наибольшей степени увеличивается экспрессия *c-jun*, химического и эмоционального – *c-fos*. Экспериментальный гипотиреоз (введение мерказолила в дозе 25 мг/кг в течение 20 дней) хотя и повышает экспрессию изученных генов сам по себе, устраняет вызванное стрессом возрастание уровней их мРНК. Малые дозы L-тироксина (1,5–3,0 мкг/кг в течение 28 дней) *per se* не влияют на них, в условиях стресса обеспечивают нормализацию тиреоидного статуса и большую стимуляцию экспрессии *c-fos* и *c-jun* в миокарде.

Ключевые слова: стресс, йодсодержащие тиреоидные гормоны, гены раннего ответа.

Gorodetskaya, I. The influence of thyroid status on stress-induced changes in the expression of early response genes *c-fos* and *c-jun* in rat myocardium / I. Gorodetskaya, O. Evdokimova // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 38–47.

The experiments in 78 outbred white male rats have demonstrated that both under physical stress (t 4–5 °C for 30 minutes) accompanied by increasing concentration of iodine-containing thyroid hormones in the blood, and chemical one (25% ethanol solution at a dose of 3.5 g/kg body weight) as well as under emotional stress (animal free swimming in a cage for 30 minutes) leading to the hormone level reduction, the expression of early response genes *c-fos* and *c-jun* in the rat myocardium was increased. The degree of increasing the mRNA levels of the above genes depends on the nature of the affecting factor. The greatest degree of *c-jun* expression was noted under physical stress, and that of *c-fos* – under chemical and emotional stresses. Experimental hypothyroidism (injection of merkazolil at a dose of 25 mg/kg for 20 days), although increases the studied gene expression in itself, eliminates the stress-induced increase in their mRNA levels. Small doses of L-thyroxine (1.5–3.0 µg/kg for 28 days) *per se* do not affect their levels, and under stress conditions provide normalization of the thyroid status and greater stimulation of *c-fos* and *c-jun* expression in the myocardium.

Key words: stress, iodine-containing thyroid hormones, early response genes.

УДК 616.9-022.7:576.8.097.3

Идентификация *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* методом ПЦР / В.В. Слипень [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 48–53. – Соавт.: Ж.Ф. Циркунова, Е.И. Гудкова, О.Ч.Глаз.

Сальмонеллез – одна из наиболее распространенных и опасных токсикоинфекций человека и животных. Актуальность проводимых исследований обусловлена высоким уровнем заболевания сальмонеллезом в Республике Беларусь, а также распространением на ее территории госпитальных полирезистентных штаммов *S. Typhimurium* служащих причиной вспышек внутрибольничного сальмонеллеза, характеризующегося высокой контагиозностью, быстрым распространением и тяжестью клинического течения. В результате проведенных исследований показана возможность идентификации *S. Typhimurium* на основании амплификации специфического для него гена жгутикового антигена *fliC* или гена малатдегидрогеназы (*mdh*). Установлено, что множественно резистентных к антибиотикам сальмонелл можно выявлять на основании присутствия у них генов фаготипа DT104.

Ключевые слова: сальмонеллы, сальмонеллез, сероварианты, праймеры, ПЦР.

PCR-Identification of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* / V. Slizen [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 48–53. – Zh. Tsykunova, E. Gudkova, O. Glaz.

Salmonellosis is one of the most widespread and dangerous bacterial infection of gastrointestinal tract in human and animals. In the nearest future serological identification of *Salmonella enterica* serotypes will be replaced by genetic serotyping on the basis of detection of serotype specific genetic markers. The study demonstrates the possibility of *S. Typhimurium* identification by amplification of gene *fliC* or gene *mdh* encoding flagella antigen phase i or malate dehydrogenase, respectively. All isolates with the determinants of phage type DT104 are required to be tested for the presence of resistance genes.

Key words: salmonella, salmonellosis, serovariants, primers, PCR.

УДК 577.21:633.111.1

Распространение 1BL.1RS транслокации в коллекции сортов и линий озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Е.А. Фомина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 54–61. – Соавт.: С.В. Куликович, С.В. Малышев, О.Ю. Урбанович.

Идентификация 1BL.1RS транслокации у сортов и линий пшеницы имеет важное практическое значение, поскольку ее присутствие может повышать устойчивость к болезням и влиять на показатели продуктивности и качества зерна. Молекулярный анализ образцов из коллекции озимой пшеницы, состоящей из 64 сортов и 7 линий зарубежной и белорусской селекции, показал, что фрагмент хромосомы 1RS несут 6 сортов и 4 линии пшеницы, что составляет 14% от общего количества тестируемых образцов. При помощи прямых и косвенных показателей была проведена сравнительная оценка технологических и хлебопекарных качеств зерна некоторых сортов озимой пшеницы, отличающихся наличием или отсутствием 1BL.1RS транслокации. Результаты могут быть использованы в селекционном процессе при подборе родительских пар для скрещивания.

Ключевые слова: озимая пшеница, 1BL.1RS транслокация, время образования теста, объем хлеба.

Distribution of the 1BL.1RS translocation in the collection of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and lines / E. Fomina [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 54–61. – S. Kulinkovich, S. Malyshev, O. Urbanovich.

Identification of the 1BL.1RS translocation in wheat cultivars and lines is of practical importance, because it can increase the disease resistance and affect indices of productivity and grain quality. The molecular analysis of samples from the winter wheat collection consisting of the 64 cultivars and 7 lines of foreign and Belarusian origin has shown that 6 cultivars and 4 lines (14 % of the total number of the tested samples) carry the 1RS chromosome fragment. Comparative evaluation of the technological and baking grain qualities of certain winter wheat cultivars differing in the presence or absence of the 1BL.1RS translocation was conducted using the direct and indirect indices. The results can be used in the breeding process to select parental pairs for crossing.

Key words: winter wheat, 1BL.1RS translocation, dough formation period, the amount of bread.

УДК 575.222.2:632.4.01/0.8:632.952

Использование ПЦР-ПДРФ метода для диагностики мутации G143A устойчивости к стробилуринам в изолятах возбудителя септориоза листьев пшеницы / Е.В. Воронкова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 62–70. – Соавт.: В.И. Лукша, О.Н. Гукасян, А.Г. Жуковский, С.Ф. Буга, Е.А. Волуевич

Впервые в Беларуси разработана и применена методика идентификации митохондриальной мутации, связанной с развитием устойчивости к стробилуринам у *Mycosphaerella graminicola*, возбудителя септориоза пшеницы, основанная на ПЦР-ПДРФ анализе. Предложены оптимальные условия для выделения и очистки ДНК, позволяющие провести ПЦР-анализ любого изолята гриба. Оптимизированы условия проведения ПЦР-ПДРФ анализа, что дало возможность оценить на наличие мутации G143A коллекцию изолятов *M. graminicola*, предоставленную РУП «Институт защиты растений НАН Беларуси», и выявить резистентные к фунгициду генотипы фитопатогена. В дальнейшем этот метод может быть применен для мониторинга мутации устойчивости к стробилуринам в популяции возбудителя септориоза листьев пшеницы, что позволит оперативно реагировать на изменение фитопатогенной ситуации в стране и оптимизировать стратегию защиты посевов от болезни.

Ключевые слова: митохондриальная мутация G143A, устойчивость к фунгицидам группы стробилуринов, возбудитель септориоза листьев пшеницы *Mycosphaerella graminicola*, ПЦР-диагностика.

The PCR-RFLP method application for identification of strobilurin resistance G143A mutation in isolates of septoria leaf blotch pathogen / E. Voronkova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 62–70. – V. Luksha, O. Gukasian, A. Zhukovski, S. Buga, E. Voluevich.

The PCR-RFLP experimental technique for identifying G143A mitochondrial mutation was first worked out and applied in Belarus. This mutation is related to development of strobilurin resistance in septoria leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. The optimum conditions for DNA extraction and purification were suggested enabling PCR analysis of any fungus isolate. The PCR-RFLP protocol was also optimized that made it possible to identify G143A mutation in the *M. graminicola* isolate collection from Plant Protection Institute of NAS of Belarus and to reveal the fungicide resistant phytopathogen genotypes. This method may be proposed for monitoring strobilurin resistance mutation in septoria wheat leaf blotch pathogen population that gives an opportunity of operative response to plant pathogen situation change in Belarus and optimization of crop protection strategy against the disease.

Key words: mitochondrial mutation G143A, fungicide resistance of strobilurin group, septoria wheat leaf blotch *Mycosphaerella graminicola* pathogen, PCR diagnostics.

УДК 631.547.1:581.19:633.521

Изменчивость накопления запасных соединений фосфора в семенах льна масличного / С.И. Вакула [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 71–77. – Соавт.: Н.В. Анисимова, В.Н. Леонтьев, В.В. Титок, А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева.

Основная форма запасания фосфора в семенах льна – фитин – это антинутриент с высокими антиоксидантными свойствами. Изучена изменчивость накопления неорганических фосфатов и фитина в семенах 27 генотипов льна масличного (2005–2009 гг.). Коэффициенты повторяемости накопления фитина (0,58) и неорганических фосфатов (0,55) в семенах льна соответствуют средней степени наследуемости исследуемых признаков. Содержание фосфатов (1,6–2,7 мг/г) и фитина (29,7–35,8 мг/г) в семенах льна достоверно коррелирует ($r = 0,5$). По результатам дисперсионного анализа распределение эффектов генотипа, среды и их взаимодействия на накопление фосфатов относительно равномерно (29,3, 38,2, 30,0 соответственно). Содержание фитина в большей мере определяется условиями выращивания (69,3%), чем влиянием генотипа (17,9%) и взаимодействия факторов (11,0%). Проведенный анализ выявил высокую экологическую пластичность и фенотипическую разнородность исследуемой коллекции генотипов льна масличного, что служит предпосылкой создания на ее основе сортов как с высоким, так и с низким содержанием фитина и фосфатов в семенах.

Ключевые слова: лен, запасные фосфаты, фитин, генетическая изменчивость.

Accumulation variability of reserve phosphorus compounds in linseed / S. Vakula [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 71–77. – N. Anisimova, V. Leontiev, V. Titok, A. Kilcheuski, L. Khotyleva.

Phytin (a dominant form of storing phosphorus in linseed) is an antinutrient with high antioxidant properties. We have studied the accumulation variability of phosphates and phytin in the 27 linseed genotypes (2005–2009). Repeatability factors of accumulation of phytin (0.58) and inorganic phosphates (0.55) correspond to the average heritability degree of traits under study. The contents of phosphates (1.6–2.7 mg/g) and phytin (29.7–35.8 mg/g) are significantly correlated ($r = 0,5$). According to the ANOVA results distribution of effects of genotype, environment and their interaction on the phosphate accumulation was relatively evenly (29.3, 38.2, 30.0, respectively). The phytin content is determined to a greater extent by the growth conditions (69.3%) than by the genotype effect (17.9%) and the factor interaction (11.0%). The analysis has revealed high ecological plasticity and phenotypic heterogeneity of the studied linseed genotype collection. Our collection can be the basis for breeding of linseed cultivars with both a high and a low content of phytin and phosphates.

Key words: linseed, reserve phosphates, phytin, genetic variability.

УДК 631.524.86:633.11:632.3

Волуевич, Е.А. Остаточный эффект преодоленных генов устойчивости мягкой пшеницы к биотрофным грибным патогенам / Е.А. Волуевич // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 78–84.

В генетическую основу частичной устойчивости мягкой пшеницы могут вносить вклад преодоленные расо-специфические *R*-гены, которые обуславливают снижение скорости развития болезни после того, как устанавливается взаимодействие растения-хозяина с патогеном. Картирование QRLs возрастной (полевой) устойчивости показывает совпадение локализации некоторых из них с известными главными преодоленными ювенильными генами. Отмечена специфичность остаточного эффекта и возможность его преодоления вследствие эволюции патогена при широком использовании генов в селекции мягкой пшеницы.

Ключевые слова: мягкая пшеница, преодоленные гены устойчивости, биотрофные грибные патогены.

Voluevich, E. Residual effect of defeated resistance genes of common wheat to biotrophic fungal pathogens / E. Voluevich // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 78–84.

Defeated race-specific *R*-genes can contribute to the genetic basis of common wheat partial resistance causing decrease in the rate of disease development soon after the interaction between the host plant and pathogen was established. Mapping of QRLs associated with age (field) resistance shows localization coincidence of some of them with known major defeated juvenile genes. The specificity of the residual effect and the ability to overcome it due to pathogen evolution at wide use of genes in wheat breeding were noted.

Key words: common wheat, defeated resistance genes, biotrophic fungal pathogens.

УДК [633.11+633.14]:631.524.86

Орловская, О.А. Оценка гибридов F₄ озимого тритикале, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения, по основным хозяйственно ценным признакам / О.А. Орловская, А.Н. Иванистов, К.Р. Кем // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 85–90.

Проведена оценка продуктивности, зимостойкости и устойчивости к наиболее распространенным грибным патогенам 5 гибридных комбинаций F₄ озимого тритикале, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения. Выявлены высокопродуктивные генотипы с устойчивостью к заболеваниям и неблагоприятным условиям перезимовки. Полученные данные свидетельствуют о перспективности вовлечения в гибридизацию образцов из мирового генофонда для создания ценного исходного материала тритикале с комплексом хозяйственно ценных признаков.

Ключевые слова: тритикале, продуктивность, зимостойкость, устойчивость к грибным патогенам и полеганию.

Orlovskaya, O. Evaluation of main agronomic traits of winter triticale F₄ hybrids, produced by crossing accessions of different ecological and geographic origin / O. Orlovskaya, A. Ivanistov, K. Kem // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 85–90.

Productivity, winter hardiness and resistance to fungal pathogens of 5 winter triticale F₄ hybrid combinations, produced by crossing accessions of different ecological and geographic origin, were evaluated. High productive genotypes with resistance to diseases and unfavorable wintering conditions were identified. The data obtained are indicative of the prospect of involving accessions from the world gene pool in hybridization for developing valuable triticale source material with commercially valuable traits.

Key words: triticale, productivity, winter hardiness, resistance to fungal pathogens, lodging.

УДК 575.174.015.3

Михайлова, М.Е. Определение полиморфизма гена эстрогенового рецептора *ESR1-PvuII*, маркера плодовитости свиней, с помощью HRM-анализа / М.Е. Михайлова, Е.Л. Романишко // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 91–96.

Для управления селекционным процессом и ведения генетического мониторинга в свиноводстве значительный интерес представляет ген эстрогенового рецептора (*ESR1*), который является ДНК-маркером плодовитости свиней. В настоящее время для определения полиморфизма *ESR1-PvuII* используется традиционный метод анализа – полимеразная цепная реакция-полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), который является достаточно затратным и длительным по времени. В данной работе для определения полиморфизма *ESR1-PvuII* в гене *ESR1* у свиней предложена технология HRM-анализа (High Resolution Melting). Отработаны условия проведения ПЦР в реальном времени, подтверждена достоверность определения генотипов AA, BB, AB, а также проанализирована эффективность HRM-метода в сравнении с методом ПЦР-ПДРФ. Была проведена апробация HRM-анализа на выборке свиней (n = 51) породы белорусская крупная белая. Полиморфизм *ESR1-PvuII* – один из ключевых ДНК-маркеров в свиноводстве, поэтому предлагаемый метод на основе технологии HRM может использоваться как экспресс-метод для массового скрининга животных.

Ключевые слова: технология HRM, ПЦР-ПДРФ, полиморфизм *ESR1-PvuII*, локусы количественных признаков (QTLs), свиноводство.

Mikhailova, M. Detection of estrogen receptor gene *ESR1-PvuII* polymorphism, marker of pig fertility, using HRM-analysis / M. Mikhailova, E. Ramanishka // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 91–96.

To control the breeding process and genetic monitoring in pig-breeding, the estrogen receptor gene (*ESR1*), which is a DNA marker of pig fertility, is of great interest. Currently, for detection of *ESR1-PvuII* polymorphism, the traditional method of analysis is used: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), which is quite expensive and time-consuming. In this study, for detecting the *ESR1-PvuII* polymorphism in the gene *ESR1* in pigs, the HRM-analysis technology (High Resolution Melting) was proposed. The conditions for conducting real-time PCR were developed, the accuracy of identifying the genotypes AA, BB, AB was verified, as well as the effectiveness of the HRM-method in comparison with the PCR-RFLP method was analysed. The HRM analysis was evaluated in Belarusian Large White breed pig sample (n=51). The *ESR1-PvuII* polymorphism is one of the key DNA markers in pig-breeding, therefore the proposed method, based on the HRM technology, can be used as an express-method for mass screening of animals.

Key words: HRM technology, PCR-RFLP, *ESR1-PvuII* polymorphism, quantitative trait loci (QTLs), pig-breeding.

УДК 636.52/58:575.113/.118

Кулибаба, Р.А. Полиморфизм генов семейства трансформирующих ростовых факторов-бета в линиях кур украинской селекции / Р.А. Кулибаба // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 97–103.

Изучен полиморфизм генов семейства трансформирующих ростовых факторов-бета в популяциях кур пород белый плимутрок, борковская барвистая и полтавская глинистая. Показано, что гены *TGF-β1*, *TGF-β2* и *TGF-β3* в изученных популяциях являются полиморфными. По локусу *TGF-β1* частоты аллелей В и F в популяции кур породы белый плимутрок составили 0,21 и 0,79; в популяции кур породы борковская барвистая – 0,54 и 0,46; в популяции кур породы полтавская глинистая – 0,31 и 0,69. По локусам *TGF-β2* и *TGF-β3* частота аллеля В составила 0,46/0,24; аллеля L – 0,54/0,76 (белый плимутрок); 0,65/0,23 и 0,35/0,77 (борковская барвистая); 0,79/0,52 и 0,21/0,48 (полтавская глинистая) соответственно.

Ключевые слова: куры, полиморфизм, трансформирующий ростовой фактор-бета, рестрикционный анализ, полимеразная цепная реакция.

Kulibaba, R. Polymorphism of transforming growth beta-factor family genes in the chicken line of Ukrainian breeding / R. Kulibaba // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 97–103.

Polymorphism of transforming growth beta-factor family genes was studied in the chicken populations of White Plymouth Rock, Borkovskaya Barvistaya and Poltava Clay breeds. *TGF-β1*, *TGF-β2* and *TGF-β3* genes were shown to be polymorphous in the studied populations. The frequencies of alleles B and F (*TGF-β1* gene) were 0.21 and 0.79 in the chicken population of White Plymouth Rock breed; those in Borkovskaya Barvistaya – 0.54 and 0.46; in Poltava Clay – 0.31 and 0.69. The frequencies of B and L alleles (*TGF-β2* and *TGF-β3* genes) were 0.46/0.24 and 0.54/0.76; 0.65/0.23 and 0.35/0.77; 0.79/0.52 and 0.21/0.48 respectively.

Key words: chickens, polymorphism, transforming growth beta-factor, restriction analysis, polymerase chain reaction.

УДК 604.6+608.3

Ермишин, А.П. Некоторые методические вопросы детекции и количественного определения генетически модифицированных составляющих в продуктах питания / А.П. Ермишин // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – Т. 17. – Минск, 2014. – С. 104–109.

Анализ наличия и количества копий рекомендуемых для выявления ГМО генетических элементов у допущенных к использованию трансгенных линий показал, что 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты содержат 11 из 17 линий сои и 48 из 54 линий и гибридов кукурузы. Остальные генетические элементы представлены лишь у небольшого количества линий. Методы детекции ГМС, основанные на выявлении в анализируемых образцах последовательностей ДНК 35S-промотора, позволяют охватить практически все ГМ-продукты, поступающие на рынок Беларуси. Дополнительно для детекции ГМ-кукурузы GA-21 целесообразно использовать тест-системы, содержащие праймеры, специфичные для этой линии. Допущенные к использованию трансгенные линии сои и кукурузы содержат различное количество копий 35S-промотора, что может искажать результаты количественного определения ГМС с использованием праймеров к этому генетическому элементу.

Ключевые слова: детекция ГМО, маркировка ГМ-продуктов, 35S-промотор, количественное определение ГМО.

Yermishin, A. Some technical aspects of detection and quantification of genetically modified components in food / A. Yermishin // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. – Vol. 17. – Minsk, 2014. – P. 104–109.

Analysis of availability and number of copies of genetic elements recommended for detecting GMOs has shown that 11 of 17 soya events and 48 of 54 maize ones and hybrids contain CaMV35S promoter. Other genetic elements are presented only in a small number of events. GMO detection methods based on revealing CaMV35S promoter are feasible for almost all GM-products available at Belarusian market. In addition, it is advisable to use specific primers for detection of GM-maize GA-21. Transgenic soya and maize events, approved for use, contain a different number of CaMV35S promoter copies that can distort the results of GMO quantification in food in case of using primers for this genetic element.

Key words: GMO detection, GMO labeling, CaMV35S promoter, GMO quantification.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ

Статьи должны быть написаны в сжатой и ясной форме и содержать:

- соответствующий индекс универсальной десятичной классификации литературы (УДК);
- название на русском и английском языках;
- инициалы и фамилии авторов на русском и английском языках;
- полное название учреждений, в которых выполнялось исследование и их почтовые адреса;
- ключевые слова (3...5 слов);
- аннотацию на русском и английском языках (ок). Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи;
- текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки «Введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение»);
- список использованных источников (оформляется в соответствии с Правилами ВАК, Приложение 2);
- дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10–12 страниц. Рекомендуемый средний объем аннотации – 500 знаков с пробелами. После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентичного содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на дискете) и на бумажном носителе в 2 экз. В виде отдельного документа представляются краткие сведения о каждом из авторов, включающие фамилию, имя, отчество, год рождения, сведения об образовании, служебные адреса, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность, область научных интересов. Необходимо представить АКТ ЭКСПЕРТИЗЫ о возможности опубликования открытой печати (для статей).

1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS-Word. Название файлов – фамилия первого автора латинскими буквами.

2. Формат бумаги А4 (210×297 мм), ориентация – книжная.

3. Поля: верхнее – 2,5 см, нижнее – 2,5 см, левое – 2,5 см, правое – 2,5 см.

4. Основной текст статьи набирается шрифтом Times New Roman, размером 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.

5. Автоматическая расстановка переносов обязательна.

6. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.

7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS-Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).

8. Вставка в текст символов (например, β , ϵ) производится только через опцию «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C^2 , C_4) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются *курсивом*. Математические формулы ($\lim$, $\sum$, $\sin$, и т.д.) и цифры набираются прямым начертанием.

9. Печатать в сложных словах дефис (минерал-индикатор, К-пространство). Тире отбивают с обеих сторон неразрывным пробелом как знак препинания между словами: система «человек — машина», «май — июнь». Тире между цифрами, напр., 20–30 чел. — не отбивается.

10. Кавычки по всему тексту должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбивают от заключенных в них слов.

11. При подготовке к печати графиков, блок-схем, диаграмм, файлы должны быть поименованы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и какими по порядку рисунками статьи являются. Графики должны иметь толщину всех линий не менее 0,2 пункта для четкого воспроизведения. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, не допускается использование сканированного текста.

12. Необходимо предоставить электронные файлы фотоматериалов, а также распечатки лазерным принтером всех иллюстраций на листе формата А4. Отсканированные фотоиллюстрации серой, черно-белой цветовой модели должны иметь разрешение 600 dpi и формат TIFF.

13. Список цитированных источников располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок д.б. написаны внутри квадратных скобок. (напр.: [1]).

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 17

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*
Переводчик *Г.А. Мартысь*
Верстка *Е.А. Клевец*
Корректор *И.В. Широкая*
Технический редактор *Е.А. Клевец*

Подписано в печать 15.08.2014. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 13,95. Уч. изд. л. 9,34. Тираж 100 экз. Заказ № 2841

Отпечатано в типографии ООО «Поликрафт»
ЛП № 02330/0494199 от 03.04.2009
220103, г. Минск, ул. Кнорина, 50, корп. 4

Оригинал-макет подготовлен ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/51 от 08.10.2013 г.
220072, г. Минск, ул. Академическая, 27