

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 21**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2016

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: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2016. – Т. 21. – 116 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,
А.И. Ковалевич, Ф.И. Привалов, А.В. Сукало, 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, Н.И. Дубовец, В.В. Титок, И.П. Шейко,
О.Н. Харкевич – члены редколлегии;
И.В. Широкая – ответственный секретарь.

УДК [577.21 + 575] (082)

ISSN 1999-9127

Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

<i>А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева, В.А. Лемеш, Т.Д. Кужир, Е.А. Сычева</i> Белорусское общество генетиков и селекционеров: прошлое, настоящее и будущее (к 50-летию) (обзорная статья).....	5
<i>О.Г. Бабак, С.В. Кубрак, Н.А. Некрашевич, Т.В. Никитинская, М.Р. Халилуев, Е.К. Шематорова, Г.В. Шпаковский, А.В. Кильчевский</i> Изучение особенностей роста и развития трансгенных растений томата (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), несущих кДНК гена <i>CYP11A1</i> животного происхождения.....	15
<i>В.А. Лемеш, Е.В. Гузенко, Е.В. Железнякова</i> Генетический полиморфизм линий «ложных трансформантов» льна-долгунца (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	23
<i>О.А. Орловская, С.И. Вакула, Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский</i> Анализ содержания запасных углеводов в эндосперме образцов различных подвидов кукурузы (<i>Zea mays</i> L.).....	31
<i>И.С. Гордей</i> Структурные изменения генома ржи при зиготической дупликации.....	37
<i>Е.Н. Сысолятин, Н.В. Анисимова, О.Г. Бабак, А.В. Кильчевский</i> Оценка эффективности метода SRAP-RGA-ПЦР для генотипирования узколистного люпина... 46	46
<i>О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович</i> Идентификация бактерий <i>Bacillus pumilus</i> с помощью видоспецифичной ПЦР	53
<i>Н.В. Воронова, М.М. Воробьева, Д.Г. Жоров, С.В. Буга</i> Применимость метода ПЦР-ПДРФ-анализа баркодинг-региона <i>COI</i> для идентификации инвазивных видов насекомых в фауне Беларуси (на примере тлей рода <i>Aphis</i> L.)	64
<i>Е.А. Аксенова, А.П. Сильванович, А.В. Михайловская, Н.Г. Даниленко</i> Особенности распределения частот полиморфных аллелей гена рецептора витамина D в популяциях этнических белорусов	71
<i>П.М. Морозик, М.Д. Амельянович, К.В. Жур, Е.В. Нестеренко, П.В. Евлеев, И.Б. Моссэ</i> Анализ генетической предрасположенности к костным переломам у спортсменов	81
<i>А.С. Кондратенко, А.И. Макаревич</i> МикроРНК-ассоциированные аспекты шизофрении. Популяционные частоты локуса rs1625579 гена <i>MIR137</i> среди коренных жителей Беларуси.....	89
<i>З.И. Бисултанова, З.Р. Бисултанова, П.М. Джамбетова</i> Анализ полиморфных вариантов генов эксцизионной репарации у женщин с раком молочной железы в чеченской популяции	99
<i>И.Э. Рубель, О.Ю. Баранов, С.В. Пантелеев, О.А. Разумова, В.А. Гуцин, В.В. Макаров</i> Изучение вирусоподобных элементов в геноме хвойных на основании данных высокопроизводительного секвенирования (краткое сообщение).....	107
Правила оформления статьи.....	113

CONTENTS

<i>A.V. Kilchevsky, L.V. Khotyleva, V.A. Lemesh, T.D. Kuzhir, E.A. Sycheva</i> Belarusian Society of Geneticists and Breeders: Past, Present and Future (by 50 th Anniversary) (a Review Article).....	5
<i>O.G. Babak, S.V. Kubrak, N.A. Nekrashevich, T.V. Nikitinskaya, M.R. Khaliluev, E.K. Shematorova, G.V. Shpakovski, A.V. Kilchevsky</i> Study of Growth and Development of Transgenic Tomato Plants (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) Carrying Animal Gene <i>CYP11A1</i> cDNA.....	15
<i>V.A. Lemesh, E.V. Guzenko, E.V. Zheleznyakova</i> Genetic Polymorphism of Flax (<i>Linum usitatissimum</i> L.) “Escapes” Lines	23
<i>O.A. Orlovskaya, S.I. Vakula, L.V. Khotyleva, A.V. Kilchevsky</i> Analysis of the Reserve Carbohydrate Content in the Endosperm of Different Maize Subspecies (<i>Zea mays</i> L.).....	31
<i>I.S. Gordej</i> Structural Changes of Rye Genome after Zygotic Duplication.....	37
<i>E.N. Sysoliatin, N.V. Anisimova, O.G. Babak, A.V. Kilchevsky</i> Estimation of SRAP-RGA PCR Method Effectiveness for Genotyping Narrow-Leaved Lupin	46
<i>O.V. Yeudakimava, V.E. Miamin, L.N. Valentovich</i> Identification of <i>Bacillus pumilus</i> Bacteria by Using Species-Specific PCR Assay	53
<i>N.V. Voronova, M.M. Varabyova, D.G. Zhorov, S.V. Buga</i> Applicability of PCR-RFLP Keys Based on <i>COI</i> Barcode Region for the Identification of Invasive Species in the Insect Fauna of Belarus (on Example of Aphids of Genus <i>Aphis</i> L.).....	64
<i>E.A. Aksyonova, A.P. Silvanovich, A.V. Mihailovskaya, N.G. Danilenko</i> Peculiarities of <i>VDR</i> Gene Polymorphic Allele Frequencies in Populations of Native Belarusians	71
<i>P.M. Marozik, M.D. Ameliyanovich, K.V. Zhur, K.V. Nestsiarenka, P.V. Yeuleyeu, I.B. Mosse</i> Analysis of Genetic Predisposition to Athletes’ Bone Fractures	81
<i>H.S. Kandratsenka, A.I. Makarevich</i> MiRNA-associated Aspects of Schizophrenia. Frequencies of Rs1625579 Polymorphism of <i>MIR137</i> Gene in the Population of Indigenous People of Belarus	89
<i>Z.I. Bisultanova, Z.R. Bisultanova, P.M. Dzhambetova</i> Analysis of Polymorphic Variants of Genes Excision Repair of Women with Breast Cancer in the Chechen Population.....	99
<i>I.E. Rubel', O.Yu. Baranov, S.V. Panteleev, O.A. Razumova, V.A. Gushchin, V.V. Makarov</i> Research of the Virus-Like Elements in the Genome of Conifers Based on the Next-Generation Sequencing Data (Short Report).....	107
Instructions to Authors.....	113

А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева, В.А. Лемеш, Т.Д. Кужир, Е.А. Сычева

БЕЛОРУССКОЕ ОБЩЕСТВО ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ: ПРОШЛОЕ, НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ (К 50-ЛЕТИЮ) (Обзорная статья)

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

Статья приурочена к 50-летию Белорусского общества генетиков и селекционеров (БОГИС) и освещает его деятельность за период 1966–2016 годы.

Ключевые слова: Белорусское общество генетиков и селекционеров (БОГИС), съезды БОГИС, генетика.

Белорусское общество генетиков и селекционеров (БОГИС) было создано след за организацией Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова в 1966 г. В работе по созданию общества принимали активное участие академик АН БССР Н.В. Турбин и заведующий отделом теоретической генетики Института генетики и цитологии АН БССР профессор П.Ф. Рокицкий. 12 ноября 1966 г. состоялось учредительное собрание Белорусского общества генетиков и селекционеров, объединившее 109 человек из 20 научно-исследовательских учреждений и вузов республики [1].

Основной задачей Общества его учредители видели возрождение и развитие различных направлений генетики и селекции в республике, повышение квалификации научных работников. Решать эти задачи планировалось через организацию регулярного генетического семинара. Детище Н.В. Турбина и П.Ф. Рокицкого, семинар собирал заинтересованных слушателей со всех уголков страны. И Н.В. Турбин, и П.Ф. Рокицкий, будучи настоящими энтузиастами науки, концентрировали вокруг себя таких же увлеченных людей, заражая их духом творчества и новаторства. Это было время освобождения научной мысли от политических догм, время восстановления в правах генетики в нашей стране после сложного периода лысенковского «средневековья». Для выступления на семинаре с лекциями по современным проблемам генетической науки приглашались не только советские, но и зарубежные специалисты (рис. 1).

Первым Президентом БОГИС в 1966 г. был избран Петр Фомич Рокицкий [1]. Благодаря его личным связям укрепилось взаимодействие белорусских ученых с учеными России и других советских республик. По приглашению академика П.Ф. Рокицкого в Минск с научными докладами приезжали его давние друзья и коллеги, выдающиеся генетики Б.Л. Астауров, Д.К. Беляев, Н.В. Тимофеев-Рессовский, С.М. Гершензон, И.А. Рапопорт и др. Эти узы дружбы не ослабли и после ухода из жизни Петра Фомича в 1977 г., когда на посту президента БОГИС его сменила член-корреспондент АН БССР Л.В. Хотылева.

О быстром росте авторитета и активности БОГИС свидетельствуют сухие строки хроники [2–7]. Так, в 1970 г. в обществе насчитывалось



Рис. 1. Н.В. Турбин, Арне Мюнтцинг (Швеция) и П.Ф. Рокицкий на генетическом семинаре в Минске (1971 г.)

154 человека и 5 коллективных членов (Институт генетики и цитологии, Институты земледелия и животноводства, Институт лесного хозяйства и Белорусская сельскохозяйственная академия). Состоялось 10 заседаний республиканского генетического семинара, на котором выступили не

только белорусские ученые, но и доктор М. Захариас из ГДР; прочитано 200 научно-популярных лекций для населения; проведено III всесоюзное совещание по полиплоидии, собравшее 250 ученых из Москвы, Ленинграда, Киева, Новосибирска, Харькова, Душанбе [2].



Рис. 2. Участники II-го съезда Белорусского общества генетиков и селекционеров (1971 г., Минск)



Рис. 3. Участники III-го съезда Белорусского общества генетиков и селекционеров (1976 г., г. Горки Могилевской обл., БГСХА)

В 1978 г. общество уже объединяло 378 человек и имело 15 отделений и секций при различных НИИ и вузах республики. Выдающимся событием этого года стал XIV Международный генетический конгресс в Москве. На нем была широко представлена белорусская наука: с докладами по различным проблемам генетики и селекции выступили ведущие ученые республики Л.В. Хотылева, Г.В. Красковский,

А.Н. Палилова, В.К. Савченко, Г.И. Лазюк, Ю.К. Фомичев. Продолжил работу республиканский генетический семинар, состоялось 7 заседаний, в числе докладчиков были ученые из Киева и Кишинева. Большое внимание уделялось пропаганде генетических знаний, выступлениям на радио и телевидении. Поддерживались связи с учеными ГДР, Болгарии, Чехословакии [5].

Хронология съездов БОГИС

Год	Название	Место проведения
1966	I-й учредительный Съезд БОГИС	г. Минск, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
1971	II-й Съезд БОГИС	г. Минск, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
1976	III-й Съезд БОГИС	г. Горки, Белорусская сельскохозяйственная академия
1981	IV-й Съезд БОГИС	г. Минск, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
1986	V-й Съезд БОГИС	г. Горки, Белорусская сельскохозяйственная академия
1992	VI-й Съезд БОГИС	г. Горки, Белорусская сельскохозяйственная академия
1997	VII-й Съезд БОГИС	г. Горки, Белорусская сельскохозяйственная академия
2002	VIII-й Съезд БОГИС	г. Минск, Белорусский государственный университет
2007	IX-й Съезд БОГИС	г. Гомель, Институт леса НАН Беларуси
2012	X-й Съезд БОГИС	г. Минск, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Значимым и насыщенным яркими событиями стал для белорусских ученых и Белорусского общества генетиков и селекционеров 1992 год. В июне этого года состоялся VI съезд БОГИС, а в ноябре в Минске прошел VI съезд Всесоюзного общества генетиков и селекционеров (ВОГИС) [8]. Организаторами съезда выступили ВОГИС, БОГИС, Институт генетики и цитологии Академии наук Беларуси, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук. В работе съезда приняли участие более 600 ученых из России, Беларуси, Украины, Молдовы, Литвы, Латвии, Эстонии, Казахстана, Туркменистана, Узбекистана, Польши. Научная программа съезда отразила современное состояние различных направлений генетики и селекции, развиваемых в странах СНГ и Балтии. На открытии съезда с

приветствием к участникам и делегатам обратился президент Академии наук Беларуси академик Л.М. Суценья, который в своем выступлении подчеркнул необходимость и важность сохранения и укрепления связей, сложившихся между учеными и научно-исследовательскими учреждениями в ходе многолетнего сотрудничества (рис. 4.). Вся дальнейшая деятельность съезда подтвердила стремление генетиков и селекционеров к установлению творческих контактов, обмену научной информацией и объединению усилий, направленных на дальнейшее развитие генетической науки.

На пленарных заседаниях были заслушаны доклады академика АН Беларуси Л.В. Хотылевой, чл.-корр. РАН С.Г. Инге-Вечтомова, академика РАСХН В.С. Шевелухи, чл.-корр. РАН Ю.П. Алтухова, академика РАН Ю.В. Ильина



В президиуме второй слева директор Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН Ю.П. Алтухов, далее академик АН Беларуси Л.В. Хотылева; член-корр. РАН С.Г. Инге-Вечтомов; член-корр. ВАСХНИЛ президент ААН РБ Антонюк В.С.

Рис. 4. Открытие VI-го съезда ВОГИС: выступление президента АН Беларуси академика Л.М. Сущени

и чл.-корр. РАН Л.И. Корочкина, которые обобщили достижения и перспективы развития фундаментальных направлений генетики и селекции. Кроме двух пленарных заседаний, приуроченных к открытию и закрытию съезда, работало 30 симпозиумов, которые подвели итоги исследований в самых разнообразных областях генетики и селекции; с докладами выступили ведущие специалисты из стран СНГ, Балтии и Польши. Состоялась стендовая сессия, на которой было представлено около 200 сообщений по следующим разделам: общая и молекулярная генетика, генетика и селекция растений, генетика и селекция животных, генетика и селекция микроорганизмов, генетика человека и медицинская генетика. Съезд подвел итоги за весь почти 30-летний период активной плодотворной деятельности ВОГИС, на нем царила атмосфера творчества, взаимопонимания и ответственности. Все отдавали себе отчет, что это последний съезд Всесоюзного общества генетиков и селекционеров, на котором было принято решение о прекращении его существования в связи с ликвидацией СССР.

Последний съезд Всесоюзного общества генетиков и селекционеров стал новой точкой отсчета в отношениях генетиков и селекцио-

неров бывшего СССР. Вместе с тем, их творческие связи не только не были утрачены, но крепили и обогащались, создавая новые возможности для объединения и интеграции в мировое научное сообщество. Немалую роль в этом сыграло **Белорусское общество генетиков и селекционеров**, научные форумы которого стали площадкой для встреч, общения, научных дискуссий (рис. 5).

БОГИС сегодня – представительная научно-общественная организация, в состав которой входят более 300 ученых из 20 профильных научных, селекционных и учебных заведений Республики Беларусь. Деятельность общества направлена на консолидацию генетиков и селекционеров республики путем выполнения совместных проектов, организации семинаров и конференций, издания коллективных трудов, а также на укрепление международных научных контактов в целях эффективного развития научных исследований по проблемам генетики и селекции. Общество возглавляет член-корреспондент А.В. Кильчевский, сменивший в 2007 г. на этом посту академика Л.В. Хотылеву, которая избрана Почетным Председателем БОГИС.

Белорусское общество генетиков и селекционеров и его базовые организации (Институт



Рис. 5. Участники VIII-го съезда Белорусского общества генетиков и селекционеров (2002 г., г. Минск, БГУ)

генетики и цитологии, Институт леса, БГУ, НПЦ по земледелию, НПЦ по животноводству, РНПЦ «Мать и дитя» и пр.) своей научной и инновационной деятельностью содействуют продвижению в стране исследований по актуальным проблемам генетической науки. В последнее десятилетие в Беларуси, как и во всем мире, получила интенсивное развитие молекулярная генетика, были существенно расширены работы, направленные на изучение структурно-функциональной организации геномов растений, животных, микроорганизмов и человека, разработку проблем генетической и клеточной инженерии, биобезопасности, создание эффективных геномных биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, спорта, охраны окружающей среды [9]. Этому в немалой степени способствовал ряд научно-аналитических докладов, подготовленных при участии БОГИС [10, 11]. Отнесение биотехнологии к приоритетам научно-технической деятельности и принятие национальных биотехнологических программ позволило вывести генетические исследования в стране на уровень, соответствующий мировым тенденциям.

В целях развития междисциплинарного и международного сотрудничества, укрепления связей генетической науки с практикой под эгидой БОГИС было инициировано проведение серии регулярных научных и научно-

практических семинаров и конференций. С 2003 г. на базе двух учреждений – Института генетики и цитологии НАН Беларуси и Мозырского государственного педагогического университета им. И.П. Шамякина (г. Мозырь – малая родина П.Ф. Рокицкого) – проводятся «Рокицкие чтения», ориентированные на укрепление связей с высшей школой, работу с молодежью. С 2007 г. на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси организуются «Жебраковские чтения» (проведено 5 форумов), проходящие в формате лекций известных зарубежных ученых-генетиков и обсуждения актуальных проблем и перспектив развития генетической науки [12–16]. Весьма символично, что на первых «Жебраковских чтениях – 2007» была представлена лекция «Тенденции современной теории эволюции» академика РАН С.Г. Инге-Вечтомова, которого с БОГИС и Институтом генетики и цитологии связывают многие годы сотрудничества и дружбы. Для обсуждения на «Жебраковских чтениях» свои лекционные доклады представили ведущие специалисты СНГ – член-корр. РАН Н.А. Янковский, академик РАН Н.А. Колчанов, член-корр. НАН Украины В.А. Кунах (рис. 6), академик НААН Украины Ю.М. Сиволап, д.б.н. А.М. Кудрявцев. Чтения неизменно собирают большую аудиторию, привлекая ученых, преподавателей, аспирантов и студентов из многих учреждений.



Рис. 6. Международная научная конференция «Преобразование геномов. III Жебраковские чтения – 2011», 18 октября 2011 г., г. Минск. Приглашенный лектор – член-корр. НАН Украины В.А. Кунах (второй справа на первом снимке)

Под патронажем БОГИС внедрена практика проведения регулярных научно-практических семинаров по направлениям «Генетика для сельского хозяйства», «Генетика для здравоохранения» и «Генетика для спорта» с участием организаций профильных министерств. Всего, начиная с 2006 г., состоялось 10 семинаров по различным тематикам. Большой резонанс получил семинар на тему «Современные генетические технологии в репродуктивной медицине» (2013 г.), организованный БОГИС совместно с ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» и предназначенный для врачей – специалистов в области репродуктивной медицины. В качестве докладчиков на семинаре выступили специалисты Института генетики и цитологии НАНБ, РНПЦ «Мать и дитя», МЧУП «Центр репродуктивной медицины», БелМАПО, ГУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отто РАМН» (Санкт-Петербург, Россия). Более 100 ученых и специалистов аграрного хозяйства собрал семинар «Геномные биотехнологии для агропромышленного комплекса (растениеводство)» (2014 г.), на котором обсуждались проблемы использования современных ПЦР-технологий для решения задач в области селекционно-генетических исследований в растениеводстве, сохранения и рационального использования генетических ресурсов растений (рис. 7). Семинар с международ-

ным участием «Генетика – спорту высших достижений» (2012 г.) был посвящен использованию новейших достижений генетики в практике отбора и подготовки спортсменов. В работе семинара приняли участие специалисты научных учреждений НАН Беларуси биологического и медицинского профилей, Республиканского центра спортивной медицины, НИИ физкультуры и спорта, федераций спорта, заинтересованных ВУЗов, а также



Слева направо: генеральный директор НПЦ НАН Беларуси по земледелию, академик НАН Беларуси Ф.И. Привалов; главный ученый секретарь НАН Беларуси, член-корр. НАН Беларуси А.В. Кильчевский; директор Института генетики и цитологии НАН Беларуси В.А. Лемеш

Рис. 7. Семинар «Геномные биотехнологии для агропромышленного комплекса (растениеводство)», 2014 г.

коллеги из Российской Федерации. Участниками семинаров неоднократно отмечалось, что такие формы сотрудничества способствуют оперативному и регулярному обмену информацией между учеными и специалистами отраслей, ускоряют внедрение достижений генетической науки в практику.

Упомянутые научные мероприятия свидетельствуют, что стоящие перед Белорусским обществом генетиков и селекционеров цели успешно реализовываются. Последний Х-ый Съезд БОГИС (8–11 октября 2012 года, г. Минск) убедительно продемонстрировал консолидацию белорусских ученых с коллегами из ближнего и дальнего зарубежья (рис. 8). Съезд и сопровождающая его Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», приуроченная к 100-летию со дня рождения академика Н.В. Турбина, стали значимыми событиями для отечественной генетики, селекции и биотехнологии, собравшими для обмена информацией, дискуссий и выработки стратегических решений представителей научной и вузовской общественности, а также работников практической сферы разных стран. Научная программа Съезда объединила и предоставила площадки для выступлений более 300 ученым и специалистам из Беларуси и стран ближнего и дальнего зарубежья – России, Украины, Казахстана, Польши, Латвии, Azerbaijan, Германии, Франции, США. В рамках пленарного (15 докладов) и секционных (69 устных и 141 стендовый доклад) заседаний были представлены последние достижения отечественных и зарубежных ученых в области генетики, селекции и биотехнологии. Отличительной чертой конференции являлась наглядная демонстрация вклада исследований в области геномных биотехнологий в решение практических задач здравоохранения и сельского хозяйства нашей республики.

Традиционно большое внимание уделяется взаимодействию БОГИС с Вавиловским обществом генетиков и селекционеров России, Украинским обществом генетиков и селекционеров и Латвийским обществом генетиков и селекционеров. В развитие многолетнего сотрудничества с российскими коллегами-генетиками двумя ведущими научными учре-

ждениями России и Беларуси генетического профиля – Институтом общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН и Институтом генетики и цитологии НАН Беларуси, подготовлена Союзная программа «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства» (2017–2021 гг.) (рис. 9).

Вместе с тем БОГИС совершенствует свою научно-организационную деятельность, вводя новые формы работы и привлекая новых партнеров. Так, в 2016 г. в г. Минске в со-



Фото слева: на трибуне академик-секретарь Отделения биологических наук НАН Беларуси, академик НАН Беларуси И.Д. Волотовский. В президиуме слева направо: член-корр. НАН Беларуси А.В. Кильчевский, академик НАН Беларуси А.В. Сукало, член-корр. НАН Беларуси С.А. Усанов, академик НАН Беларуси Л.В. Хотылева

Рис. 8. Х Съезд Белорусского общества генетиков и селекционеров. Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (к 100-летию со дня рождения академика Н.В. Турбина), Минск, 2012 г.



В президиуме слева направо: руководитель НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, академик РАН В.П. Пузырев; главный ученый секретарь НАН Беларуси, член-корр. НАН Беларуси А.В. Кильчевский; заместитель Государственного секретаря – член Постоянного комитета Союзного государства А.К. Дейко; директор Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, член-корр. РАН Н.А. Янковский

Рис. 9. Совещание по Союзной программе, 2015 г., г. Минск, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

трудничестве с Европейской биотехнологической ассоциацией (European Biotechnology Thematic Network Association, EBTNA), имеющей большой опыт реализации программ, касающихся образования и профессиональной подготовки в сфере биотехнологии, была проведена Первая Европейская биотехнологическая школа. В работе школы приняли участие около 100 человек (лекторов и участников). Молодым ученым Национальной академии наук Беларуси прочитали лекции ведущие профессора, работающие в сфере биотехнологий, стран Европейского Союза, а также Республики Беларусь. В рамках работы школы прошли круглые столы, дискуссии, постерные сессии, на которых молодые ученые представили свои исследования.

БОГИС активно участвует в научно-издательской деятельности. Базовыми организациями общества на регулярной основе издаются 5 сборников научных трудов, включенные ВАК Беларуси в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований по биологической, медицинской и сельскохозяйственной отраслям науки. Только за последние пять лет членами общества опубликовано более 30 книжных изданий, 14 учебных и учебно-методических пособий

для школьников, студентов и магистрантов. Важным достижением в жизни БОГИС стал выход четырехтомного издания «Генетические основы селекции растений», к работе над которым были привлечены ведущие ученые-члены общества [17–20]. Этот уникальный труд обобщил результаты пятидесятилетних исследований белорусских ученых, направленных на разработку современных генетически обоснованных методов селекции, и по праву был удостоен Премии Национальной академии наук Беларуси (2015 г.).

В преддверии XI съезда Белорусского общества генетиков и селекционеров (г. Минск, 2016 г.), который состоится в год 50-летия БОГИС, общество продолжает славные традиции, заложенные его основателями: содействует развитию генетики и селекции в республике, сплачивает единомышленников, способствует интеграции генетической науки с практикой.

Список использованных источников

1. Савченко, В.К. Об организации белорусского общества генетиков и селекционеров / В.К. Савченко // Весці АН БССР, Сер. біял. навук. – 1967. – № 2. – С. 127.
2. Ракіцкі, П.Ф. Аб рабоце Беларускага таварыства генетыкаў і селекцыянераў

імя М.І. Вавілава за 1970 г. / П.Ф. Ракіцкі, У.К. Саўчанка // Весці АН БССР, Сер. біял. навук. – 1971. – № 5. – С. 121–122.

3. Ракіцкі, П.Ф. Аб рабоце Беларускага таварыства генетыкаў і селекцыянераў імя М.І. Вавілава за 1971 г. / П.Ф. Ракіцкі, У.К. Саўчанка // Весці АН БССР, Сер. біял. навук. – 1972. – № 3. – С. 127–128.

4. Ракіцкі, П.Ф. Інфармацыя аб III з'ездзе Беларускага таварыства генетыкаў і селекцыянераў імя М.І. Вавілава / П.Ф. Ракіцкі, В.К. Саўчанка, А.Д. Ахраменка // Весці АН БССР, Сер. біял. навук. – 1976. – № 6. – С. 125.

5. Хатылева, Л.У. Аб рабоце Беларускага таварыства генетыкаў і селекцыянераў імя М.І. Вавілава за 1978 г. / Л.У. Хатылева, А.Д. Ахраменка // Весці АН БССР, Сер. біял. навук. – 1979. – № 3. – С. 130–132.

6. Хатылева, Л.У. Аб рабоце Беларускага таварыства генетыкаў і селекцыянераў імя М.І. Вавілава у 1981 г. / Л.У. Хатылева, А.Г. Давыдзенка // Весці АН БССР, Сер. біял. навук. – 1982. – № 5, С. 120–121.

7. Хатылева, Л.У. V з'езд Беларускага таварыства генетыкаў і селекцыянераў / Л.У. Хатылева, Т.Д. Кужыр // Весці АН БССР, Сер. біял. навук. – 1987. – № 3. – С. 118–119.

8. Хатылева, Л.У. VI з'езд таварыства генетыкаў і селекцыянераў імя М.І. Вавілава (Мінск) / Л.У. Хатылева, Т.Д. Кужыр // Весці АН Беларусі, Сер. біял. навук. – 1993. – № 2. – С. 120–121.

9. Кильчевский, А.В. Развитие современной белорусской генетической школы / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева, Е.А. Сычева // Наука и инновации. – 2012. – № 12 (118). – С. 50–56.

10. Кильчевский, А.В. Состояние и перспективы развития геномики в Республике Беларусь / А.В. Кильчевский // Научно-аналитический доклад. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2010. – 18 с.

11. Кильчевский, А.В. Геномные биотехнологии для инновационного развития отраслей народного хозяйства Беларуси / А.В. Кильчевский, Е.А. Сычева // Научно-аналитический доклад. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2012. – 22 с.

12. Инге-Вечтомов, С.Г. Тенденции современной теории эволюции / С.Г. Инге-Вечтомов // Жебраковские чтения I. Преобразование геномов (лекция прочитана 20 дек. 2007 г.). – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2007. – 24 с.

13. Янковский, Н.К. Эволюционные, медицинские и социальные аспекты генетики и геномики человека / Н.К. Янковский // Жебраковские чтения II. Преобразование геномов (лекция прочитана 27 окт. 2009 г.). – Минск: Право и экономика, 2011. – 22 с.

14. Кунах, В.А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений / В.А. Кунах // Жебраковские чтения III. Преобразование геномов (лекция прочитана 18 окт. 2011 г.). – Минск: Право и экономика, 2011. – 54 с.

15. Сиволап, Ю.М. Специфичность генома и селекция растений / Ю.М. Сиволап // Жебраковские чтения IV. Преобразование геномов (лекция прочитана 26 ноября 2013 г.). – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2013. – 32 с.

16. Колчанов, Н.А. Регуляторные генетические системы: компьютерно-экспериментальный анализ и моделирование / Н.А. Колчанов // Жебраковские чтения V. Преобразование геномов (лекция прочитана 11 ноября 2014 г.). – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2013. – 32 с.

17. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 1. Общая генетика растений / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларуская навука, 2008. – 551 с.

18. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 2. Частная генетика растений / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларуская навука, 2010. – 579 с.

19. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларуская навука, 2012. – 489 с.

20. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларуская навука, 2014. – 653 с.

A.V. Kilchevsky, L.V. Khotyleva, V.A. Lemesh, T.D. Kuzhir, E.A. Sycheva

**BELARUSIAN SOCIETY OF GENETICISTS AND BREEDERS: PAST,
PRESENT AND FUTURE (by 50th ANNIVERSARY)**

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

The Article is dedicated to the 50th anniversary of the Belarusian Society of Geneticists and Breeders (BSGB) and highlights its activities for the period of 1966–2016.

Key words: Belarusian Society of Geneticists and Breeders (BSGB), BSGB congresses, genetics.

Дата поступления статьи 28 сентября 2016 г.

О.Г. Бабак¹, С.В. Кубрак¹, Н.А. Некрашевич¹, Т.В. Никитинская¹, М.Р. Халилуев²,
Е.К. Шематорова³, Г.В. Шпаковский³, А.В. Кильчевский¹

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РОСТА И РАЗВИТИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.), НЕСУЩИХ КДНК ГЕНА *CYP11A1* ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: kilchev@presidium.bas-net.by

²Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева

Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Оценка влияния функционально активных генов животного происхождения на стероидогенез растений проводилась на трансгенных растениях томата, содержащих кДНК гена *CYP11A1* цитохрома P450. Изучены морфологические и биометрические признаки у двух трансгенных линий томата в поколениях T₀–T₂. Общим для трансгенных линий являлось снижение урожайности по сравнению с исходным сортом. Выявлены отличительные особенности каждой линии. Линия № 4 характеризовалась ускоренным темпом развития, линия № 7 – удлиненным вегетационным периодом, нарушенным формированием генеративной системы, повышенной устойчивостью к стрессовым факторам.

Ключевые слова: томат, ген цитохрома P450scs, трансгенные растения.

Введение

В настоящее время в исследовании механизмов действия растительных гормонов наиболее перспективным представляется использование мутантных или генетически модифицированных растений. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в изучении гормональной регуляции онтогенеза растений, недостаточно изучены пути передачи сигнала отдельных фитогормонов и система их рецепции. Полифункциональность фитогормонов и способность влиять на многие физиологические процессы затрудняет выявление специфики ответа конкретного фитогормона. В этом отношении особенно слабо изучены стероиды и стероидные гормоны, играющие важную роль в регуляции физиологических процессов как у животных, так и у растений.

Сходство метаболизма стероидов в клетках млекопитающих и растительных брассиностероидов позволяет оценить влияние функционально активных генов животного происхождения на стероидогенез растений, в связи с этим возрос интерес к изучению генов семейства цитохрома P450 животного происхождения [1, 2]. Одним

из представителей этого семейства является ген *CYP11A1*, кодирующий цитохром P450scs (cholesterol side chain cleavage enzyme), который катализирует отщепление боковой цепи холестерина с образованием прегненолона – предшественника стероидных гормонов животных. В проведенных ранее исследованиях показано, что белковый продукт этого гена в трансгенных растениях табака и рапса способен интегрироваться в стероидогенную систему растений и оказывать регуляторное влияние на формирование ряда фенотипических и физиологических изменений, имитирующих действие эндогенных брассиностероидов [3–5].

Целью исследований было изучение особенностей роста и развития трансгенных растений томата поколений T₀, T₁ и T₂, несущих в геноме кДНК гена *CYP11A1* цитохрома P450scs, и исследования этой чужеродной вставки в ряду поколений.

Материалы и методы

Трансгенные растения томата были получены в лаборатории механизмов генной экспрессии Института биоорганической химии

РАН. Для генетической трансформации использовали бинарный вектор pBI121mod-P450_{SCC}, содержащий полноразмерную кДНК гена *CYP11A1*, кодирующего цитохром P450_{SCC} из коры надпочечников быка, и селективный ген *nptII*, обеспечивающий устойчивость к антибиотику канамицину. Трансформацию растений томата проводили методом совместного культивирования семядолей 12-дневных асептических проростков с суспензией *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0. Наличие селективного (*nptII*) и целевого (*CYP11A1*) генов у полученных канамицин-устойчивых первичных трансформантов томата проводили с помощью ПЦР со специфическими праймерами. Интеграция целевого гена была отмечена у 6 линий независимых трансформантов (T₀), эффективность генетической трансформации при использовании векторной конструкции pBI121mod-P450_{SCC} составила 1,5% [6]. Укорененные *in vitro* независимые трансгенные растения были адаптированы к почвенным условиям и выращены в остекленном боксе.

Морфобиологическая оценка растений поколений T₀, T₁ и T₂ проводилась на Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси в условиях закрытого грунта. Контролем служил исходный раннеспелый детерминантный сорт Рекордсмен. В поколении T₁ проведена оценка 2 линий трансформантов по признакам: развитие проростков, окраска листовой пластинки, характер роста главного и боковых побегов, развитие цветочных кистей, формирование завязи [5]. Поколение T₂ изучали на двух линиях трансформантов, представленных образцами 7-2, 7-4, 7-5, 7-15, 7-21, 7-27, 7-29 линии № 7 и образцами 4-3, 4-7, 4-18, 4-32, 4-34, 4-36 линии № 4. Учет данных биометрических признаков и урожайности проводили с июля по сентябрь. Высоту растений измеряли через 30, 60 и 120 дней после высадки в теплицу (соответственно в июне, июле и сентябре), количество кистей на главном стебле через 60 дней выращивания в закрытом грунте (июль), среднюю длину междоузлий измеряли в середине вегетации (июль) и в конце вегетационного периода (сентябрь). Объем выборки – восемь растений (две делянки по четыре растения каждого образца).

Геномную ДНК выделяли из ткани взрослых растений с использованием DNA Purification Kit (Thermo scientific). Наличие встройки рекомбинантного гена у растений поколения T₂ проверяли проведением амплификации с праймерами, специфичными к последовательности кДНК гена *CYP11A1*: 5'-CCACATCGAGAACTTCCAGAAG-3' (прямой) и 5'-CTGGTGTGGAACATCTTGTAGACG-3' (обратный), размер целевого фрагмента – 502 п.н. (рис. 1)

Результаты и обсуждение

В поколении T₀ исследованы 6 линий растений-трансформантов (линии № 1, 2, 3, 4, 7, 8), которые были переведены в условия *in vivo*. Фенотипические различия между линиями наблюдались уже на ранних стадиях роста, достигая максимального проявления во время цветения второй-третьей кисти. Растения линии № 2 характеризовались наличием образцов как с типичным детерминантным формированием побегов (как у исходного сорта Рекордсмен), так и с укороченными побегами, характерными для штамбовых форм. Растения-трансформанты линий № 3 и № 8 отличались неравномерной окраской листовых пластинок с темно-зелеными и светло-зелеными участками. Характерные особенности развития цветочных кистей отмечены у линии № 3 (сложная кисть), № 7 и № 8 (2–4 бутон на кисти). Общей особенностью линий трансформантов являлась частичная или полная стерильность цветков и бессемянность образующихся плодов. Образцы линии № 8 формировали бессемянные плоды нетипичной формы. Полноценные семена, пригодные для выращивания последующих поколений, сформировали линии № 4 и № 7.

Морфобиологическая оценка поколения T₁ проведена на линиях № 4 и № 7. На стадии проростков у 40% растений линии № 7 отмечено развитие 3 семядолей, а 15% проростков формировали по 4 семядоли. В целом, линия № 4 была близка по развитию к контролю, а линия № 7 имела более интенсивную зеленую окраску и крупные листовые пластинки. На дальнейших этапах онтогенеза четкие различия наблюдались во время цветения и завязывания плодов. На этапе

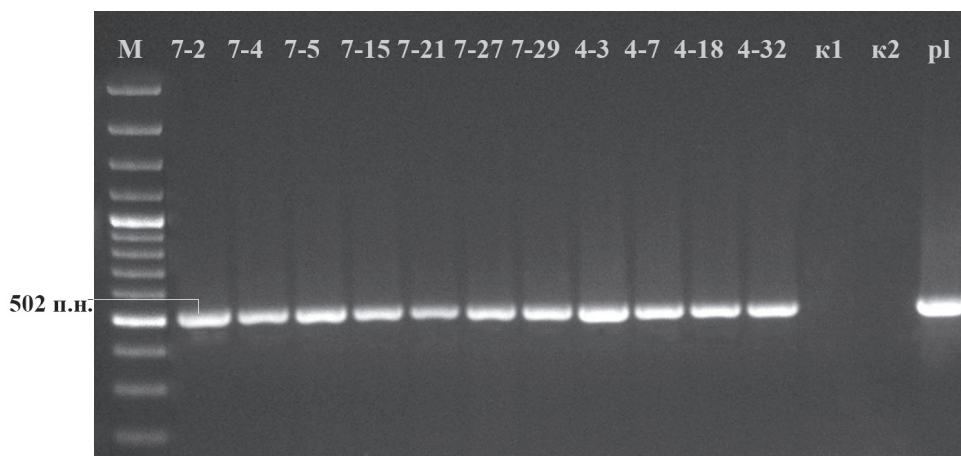
цветения у ряда растений линии № 7 наблюдалось развитие крупных чашелистиков, при этом пестик и тычинки полностью высохли. Формирование завязи у линии № 4 было на уровне контроля, а у линии № 7 – значительно ниже, как у большинства линий поколения T_0 . Основная часть бутонов опала после цветения, не завязывая плодов. При этом часть завязавшихся плодов являлась частично или полностью бессемянными. Важной особенностью, отличающей развитие растений-трансформантов линии № 4, являлось более раннее формирование крупных по массе плодов.

Наследование встройки чужеродного гена растениями поколения T_2 исследовали при помощи ПЦР с праймерами, специфичными к последовательности кДНК гена *CYP11A1* (рис. 1).

Растения поколения T_2 выращивались в теплице. В течение первых 30 дней после высадки в теплицу (июнь) контрольный сорт Рекордсмен на 19,9–22,4 см превосходил по высоте трансформированные линии, которые на этом этапе были почти неразличимы по данному признаку (табл. 1). Через 60 дней выращивания в теплице (июль) более интенсивным ростом по-прежнему характеризовался контрольный сорт, высота обеих линий различалась незначительно. В течение следующих двух месяцев были отмечены более четкие различия в скорости роста растений

трансгенных линий по сравнению с контрольным сортом. Высота растений контрольного сорта за этот период практически не изменилась. Высота растений линии № 4 в течение двух месяцев увеличилась на 13,8 см, максимальный прирост наблюдался у образцов 4-7 и 4-18 (на 30,3 см и 19,8 см соответственно). Наиболее значительным увеличением высоты характеризовались растения линии № 7 (в среднем на 44,3 см). В конце сентября у растений линии № 4 и контрольного сорта период вегетации заканчивался, а растения линии № 7 продолжали расти в высоту, формируя новые цветочные кисти. Среднее значение высоты растений этой линии составило 158,4 см, при этом у отдельных растений высота достигала 210–247 см. Усиление роста в конце вегетационного периода наблюдалось у образцов линии № 7 как в поколении T_2 , так и в поколении T_1 . Подобная тенденция, по-видимому, является устойчивой характеристикой данной линии.

В качестве признака, характеризующего особенности развития растений томата, использовали признак «количество кистей на главном стебле», подсчитанное в июне через 60 дней после высадки в теплицу (табл. 2). Растения линии № 4 превосходили по этому признаку как контрольный сорт, так и растения линии № 7. У растений линии № 4 среднее значение этого признака составило 7,2 шт., достигая 8 кистей на главном стебле у образца 4-3.



7-2, 7-4, 7-5, 7-15, 7-21, 7-27, 7-29 – индивидуальные растения линии № 7; 4-3, 4-7, 4-18, 4-32, – индивидуальные растения линии № 4; K1, K2 – контрольные растения; pl – плаزمида pBI121mod-P450_{SCC}; M – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

Рис. 1. ПЦР-анализ геномной ДНК растений томата с праймерами, специфичными к кДНК гена *CYP11A1*

В то время как у образцов линии № 7 среднее число кистей на главном стебле составило 5,8 шт., с минимальным значением у генотипа 7-27 (2,7 кисти на главном стебле) на данном этапе. Через 120 дней после высадки в теплицу (сентябрь) большая часть растений линии № 4 сформировала верхушечные кисти и их рост прекратился. У растений исходного де-

терминантного сорта Рекордсмен и линии № 7 продолжался рост главного стебля. Характер роста и развития линии № 4 сопоставим с литературными данными о том, что более интенсивным созреванием и сокращением периода вегетации характеризовались трансгенные растения табака, экспрессирующие кДНК цитохрома P450scs [3, 7].

Таблица 1

Средняя высота растений-трансформантов томата поколения T₂, выращенных в условиях закрытого грунта

№ п/п	Наименование образца	Высота растений (июнь), см	Высота растений (июль), см	Прирост (июнь-июль), см	Высота растений (сентябрь), см	Прирост (июль-сентябрь), см	Общий прирост (июнь-сентябрь), см
1	Рекордсмен	79,9	138,1	58,3	139,1	1,0	59,2
2	4-3	57,1	110,6	53,5	116,8	6,2	59,7
3	4-7	66,1	125,6	59,5	155,9	30,3	89,8
4	4-18	61,1	100,8	39,6	120,5	19,8	59,4
5	4-32	63,8	117,8	54,0	134,3	16,6	70,6
6	4-34	54,8	110,4	55,6	116,6	6,2	61,9
7	4-36	57,1	111,3	54,1	115,1	3,8	58,0
Среднее по линии № 4		60,0	112,8	52,7	126,5	13,8	66,5
8	7-2	60,8	118,6	57,9	165,0	46,4	104,3
9	7-4	64,8	122,4	57,6	162,3	39,9	97,6
10	7-5	63,0	120,4	57,4	170,3	49,9	107,3
11	7-15	61,8	116,9	55,2	149,5	32,6	87,8
12	7-21	58,0	117,6	59,6	167,0	49,4	109,0
13	7-27	33,6	88,6	55,0	136,6	48,0	103,0
14	7-29	57,5	114,5	57,0	158,4	43,9	100,9
Среднее по линии № 7		57,1	114,1	57,1	158,4	44,3	101,4

Таблица 2

Среднее количество кистей и длина междоузлий растений-трансформантов томата поколения T₂, выращенных в условиях закрытого грунта

Наименование образца	Количество кистей на главном стебле, шт.	Длина междоузлий, см	Наименование образца	Количество кистей на главном стебле, шт.	Длина междоузлий, см
Рекордсмен	6,3	10,8	7-2	5,6	8,6
4-3	8,0	9,2	7-4	7,1	10,1
4-7	6,8	9,3	7-5	6,8	9,9
4-18	6,5	8,6	7-15	6,8	8,6
4-32	7,6	9,3	7-21	6,6	8,8

Продолжение табл. 2

Наименование образца	Количество кистей на главном стебле, шт.	Длина междоузлий, см	Наименование образца	Количество кистей на главном стебле, шт.	Длина междоузлий, см
4-34	7,6	9,1	7-27	2,7	10,5
4-36	6,9	9,3	7-29	5,0	9,4
Среднее по линии № 4	7,2	9,1	Среднее по линии № 7	5,8	9,4

Признак «длина междоузлий» характеризует особенности роста главного стебля растений томата. Через 60 дней выращивания в закрытом грунте длина междоузлий контрольного сорта и обеих трансгенных линий различалась незначительно (табл. 2). Через 120 дней после высадки в теплицу длина междоузлий растений контрольного сорта и линии № 4 практически не изменилась, в то время как у растений линии № 7 отмечено резкое увеличение этого признака с максимальным значением 16–17 см у образцов 7-2, 7-4. На рис. 2 показана длина междоузлий, сформированных в конце вегетационного периода у линий трансформантов и контрольного сорта.

Наблюдаемые эффекты, возможно, связаны со спецификой гормональной регуляции ростовых процессов у изучаемых трансгенных линий, обусловленной различным уровнем экспрессии целевого гена или изменением уровня экспрессии других генов в области встраивания векторной конструкции. В ростовых процессах участвует комплекс фитогормонов, в том числе

и брассиностероиды, которые способны усиливать рост растяжением и аддитивно взаимодействовать с гиббереллинами [8]. Функционально активный рекомбинантный цитохром P450scs, встраиваясь в стероидогенную систему растений, приводит к биосинтезу новых биологически активных стероидных соединений с активностями, аналогичными действию брассиностероидов [3]. Их возможный синергизм с гиббереллинами может оказать стимулирующее действие на рост стебля.

Общей особенностью линий трансформантов поколения T_2 являлось нарушение развития генеративной системы, отмеченное нами еще в предыдущих исследованиях у поколения T_1 [5]. Часть бутонов опадала после цветения, у некоторых образцов формировались нетипичные крупные чашелистики и полностью отсутствовали тычинки и пестик. Развитие семян в сформированных плодах отличалось у линии № 4 и линии № 7 (рис. 3). Значительная часть плодов линии № 7 была бессемянной или

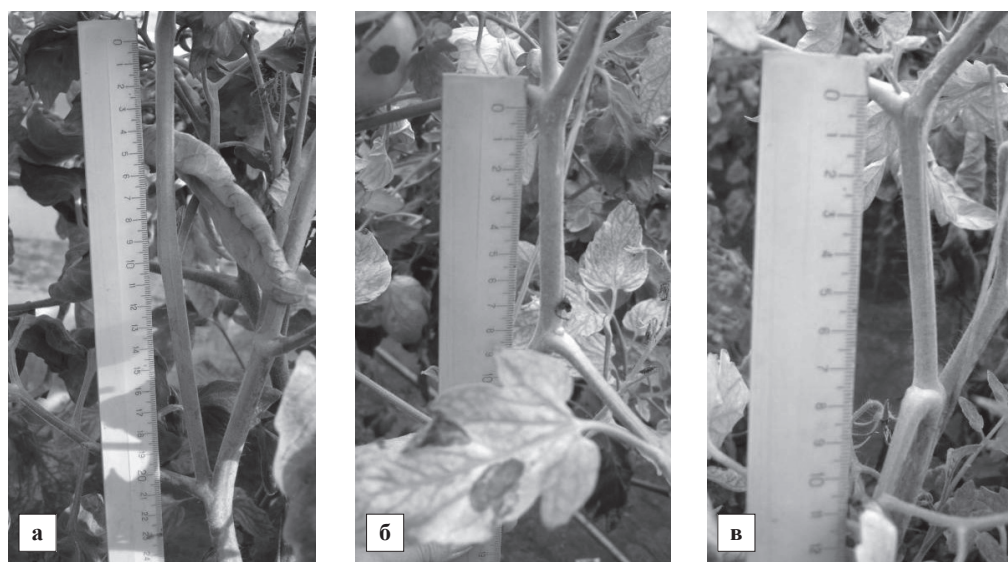


Рис. 2. Междоузлия растений трансгенных линии и контрольного сорта, измеренные через 120 дней после высадки в теплицу: а – образец 7-2 (линия № 7), б – образец 4-36 (линия № 4), в – сорт Рекордсмен



Рис.3. Осемененность плодов растений линий № 4 и № 7: а – образец 4-18, б – образец 7-21

с семязачатками, в то время как у плодов линии № 4 наблюдалось нормальное развитие семян. Снижение фертильности растений линий трансформантов, по-видимому, связано с нарушением развития пыльников, что в свою очередь является результатом выявленного ранее снижения содержания (24R)-брасиностероидов, характерного для трансгенных растений, экспрессирующих кДНК *CYP11A1* [3].

Наряду с морфологическими признаками у линий поколения T_2 оценивались признаки урожайности (табл. 3). Согласно полученным данным, все образцы трансгенных линий № 4 и № 7 уступали исходному сорту по изучаемым

признакам. Так, снижение общей урожайности на 35% и 75% наблюдалось в среднем по линии № 4 и линии № 7 по сравнению с исходным сортом соответственно.

Отмеченное выше более интенсивное созревание, характерное для растений линии № 4, определяло увеличение ранней урожайности. По всем показателям урожайности растения линии № 4 превосходили растения линии № 7. По общей массе плодов и по количеству плодов с деланки разница между двумя линиями была более чем в два раза. Обращает на себя внимание образец 4-32, который по признакам урожайности превосходил остальные трансгенные образцы.

Таблица 3

Значения признаков урожайности растений-трансформантов томата T_2

№ п/п	Наименование образца	Урожайность красных плодов, кг/м ²	Общая урожайность, кг/м ²	Количество плодов на растении, шт	Средняя масса плода, г
1	Рекордсмен	8,01	8,01	26,8	74,5
2	4-3	4,60	4,60	17,2	65,4
3	4-7	5,09	5,58	28,8	46,5
4	4-18	4,65	4,73	19,2	59,0
5	4-32	6,91	6,97	26,0	64,5
6	4-34	4,51	4,51	15,5	70,6
7	4-36	5,56	5,72	20,2	68,2
Среднее по линии № 4		5,22	5,35	21,0	62,3
8	7-2	1,03	1,03	8,0	32,3
9	7-4	3,13	3,13	20,0	37,7
10	7-5	2,25	2,34	18,8	30,8
11	7-15	1,76	1,80	10,5	42,0

Продолжение табл. 3

№ п/п	Наименование образца	Урожайность красных плодов, кг/м ²	Общая урожайность, кг/м ²	Количество плодов на растении, шт	Средняя масса плода, г
12	7-21	1,37	1,64	16,2	25,1
13	7-27	1,89	1,93	9,8	47,4
14	7-29	1,67	1,82	16,2	28,2
Среднее по линии № 7		1,87	1,95	14,2	34,8

Важной отличительной особенностью растений T₁ и T₂ линии № 7 являлось отсутствие признаков поражения патогенами. Вегетативные органы растений оставались интенсивно зелеными до конца вегетационного периода. На основании ранее проведенных лабораторно-полевых испытаний выявлена большая степень устойчивости к засухе у трансгенных растений линии № 7, выделены образцы 7-15, 7-21, 7-27, превышающие контрольный сорт по способности адаптироваться к засухе [9]. В дальнейшем планируется провести комплексный анализ устойчивости трансгенных линий к абиотическим и биотическим факторам.

Заключение

Таким образом, у двух трансгенных линий томата, содержащих в геноме кДНК *CYP11A1*, которая стабильно передается при семенном размножении, выявлены общие закономерности проявления признаков и фенотипические различия по показателям роста, развития и формированию плодов по сравнению с исходным сортом Рекордсмен. Общим для трансгенных линий являлось снижение урожайности по сравнению с исходным сортом. Образцы линии № 7 значительно уступали по урожайности, как исходному сорту, так и линии № 4. Растения линии № 4 характеризовались скороспелостью, нормальным формированием плодов и семян. Отличительными особенностями растений линии № 7 были частичная стерильность и слабое развитие завязавшихся плодов, усиленный рост междоузлий, удлиненный период вегетации. Наибольшие фенотипические отличия между изучаемыми линиями трансформантов проявлялись в конце вегетационного периода. Положительной характеристикой растений линии № 7 являлась устойчивость к биотическим и абиотическим факторам. Особенности роста и

развития обеих линий относительно контрольного сорта, имеющие однотипное проявление в поколениях T₁ и T₂, предположительно могут быть связаны с изменениями функционирования гормональной системы растений.

Исследования выполняются при финансовой поддержке Российского (РФФИ, проект № 16-54-00227) и Белорусского республиканского (БРФФИ, проект № Б16Р-129) фондов фундаментальных исследований.

Список использованных источников

1. Progesterone: its occurrence in plants and involvement in plant growth / M. Iino [et al.] // *Phytochemistry*. – 2007. – Vol. 68. – P. 1664–73.
2. New evidence of similarity between human and plants steroid metabolism: 5 α -reductase activity in *Solanum malacoxylon* / F. Rosati [et al.] // *Endocrinology*. – 2003. – Vol. 144. – P. 220–229.
3. Создание и характеристика трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L., экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450scs / С.Г. Спивак [и др.] // *Генетика*. – 2009. – Т. 45. – С. 1217–1224.
4. Получение трансгенных растений ярового рапса (*Brassica napus*), экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450scs животного происхождения / А.М. Шишлова-Соколовская [и др.] // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2011. – № 1. – С. 27–32.
5. Физиолого-биохимическая характеристика трансгенных растений семейства *Solanaceae* (табак, томат), экспрессирующих кДНК ключевого фермента стероидогенеза животных / О.Г. Бабак [и др.] // II Междун. науч. конф. «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», Минск, 13–16 окт. 2015 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2015. – С. 59.
6. Получение и характеристика первичных трансгенных растений томата, содержащих полноразмерную кДНК гена *CYP11A1*,

кодирующего цитохром P450_{scs} из коры надпочечников быка / М.Р. Халилуев [и др.] // V Всероссийский симпозиум «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность». – Москва, 2014. – С. 211–215.

7. Некоторые особенности метаболизма стероидов в трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum*, несущих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{scs} из коры надпочечников быка / С.Г. Спивак [и др.] // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36. – С. 241–250.

8. Шакирова, Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция / Ф.М. Шакирова. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.

9. Стрессоустойчивость трансгенных растений томата (*Solanum lycopersicum* L.), экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{scs} животного происхождения / С.В. Кубрак [и др.] // Материалы VI Всероссийского симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» (в печати).

O.G. Babak¹, S.V. Kubrak¹, N.A. Nekrashevich¹, T.V. Nikitinskaya¹, M.R. Khaliluev²,
E.K. Shematorova³, G.V. Shpakovski³, A.V. Kilchevsky¹

STUDY OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF TRANSGENIC TOMATO PLANTS (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) CARRYING ANIMAL GENE *CYP11A1* cDNA

¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy
Moscow, 127550, Russia

³M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of the Russian Academy of Sciences
Moscow, 117997, Russia

The assessment of functionally active animal genes' effect on steroidogenesis in plants was carried out on transgenic tomato plants containing cDNA of *CYP11A1* gene of P450_{scs} cytochrome. Morphologic and biometric characteristics of two transgenic tomato lines of T₀-T₂ generations were studied. Common to the transgenic lines was the reduction of yields as compared to the original variety. Distinctive features for each line were revealed. Line No. 4 is characterized by the accelerated development rate, line No. 7 is characterized by longer growing season, impaired by generative system formation and increased resistance to stress factors.

Key words: tomato, cytochrome P450 gene, transgenic plants

Дата поступления статьи 2 сентября 2016 г.

В.А. Лемеш, Е.В. Гузенко, Е.В. Железнякова

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛИНИЙ «ЛОЖНЫХ ТРАНСФОРМАНТОВ» ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

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

Стрессовое воздействие является механизмом, запускающим процессы, вызывающие резкий рост числа мутаций и других геномных перестроек. В клетках растений, культивируемых *in vitro*, происходят генные мутации, частота которых достаточно велика и может быть использована для повышения генетического разнообразия культивируемых растений. Проведенный молекулярно-генетический анализ с помощью RAPD-, ISSR-, SSR-, IRAP-, REMAP-маркеров позволил зафиксировать изменения в геноме потомства растений «ложных трансформантов» льна-долгунца и выявить отличия их генетической структуры от исходных форм.

Ключевые слова: лен-долгунец, «ложные трансформанты», соматическая изменчивость, молекулярные маркеры.

Введение

Условия внешней среды могут вызывать весьма существенные генотипические изменения, имеющие в определенной степени направленный характер и передающиеся по наследству. Особенность проявления стресса заключается в том, что растение, будучи лишенным пространственной подвижности, необходимой для поиска лучшего места обитания, компенсирует это повышенной геномной и физиологической «подвижностью», «пластичностью», позволяющей гибко приспосабливаться к стрессовым факторам различной природы [1].

Лен относится к растениям, обладающим «пластичным» геномом. Существуют экспериментальные данные, указывающие на сложность системы генетического контроля у льна, в частности условия окружающей среды (лимитирующие факторы) оказывают значительное влияние на аллельную структуру генов, контролирующих количественные признаки. Показано, что при выращивании одного поколения растений льна в разных контролируемых стрессовых условиях (несбалансированность минеральных удобрений N:P:K, специфический температурный режим и др.) появляются стабильные линии — генотрофы, отличающиеся одна от другой и от исходной линии не только по ряду морфологических и биохимических признаков, но и по общему количеству ядерной ДНК, по числу генов, кодирующих 25S, 18S и 5S рибосомные РНК [2–6].

Существенное влияние на геномную изменчивость оказывают стрессовые условия культивирования *in vitro*. Феномен соматической изменчивости растений представляет собой резкое повышение наследственной вариабельности культивируемых клеток и тканей, выявляемой в потомстве растений-регенерантов. Результаты генетического анализа соматических вариантов однозначно доказывают мутационную природу возникающих *in vitro* изменений. На основе соматической изменчивости получены линии льна, устойчивые к экстремальным факторам среды [7–10], гербициду хлорсульфону [11], грибным заболеваниям [12], алюмоустойчивые формы [13].

Последствия воздействия генетической трансформации любого вида также могут рассматриваться как сложный, многоуровневый биотический стресс. Трансформируемое растение подвергается нескольким видам стрессового воздействия: поранение, контакт с патогенным микроорганизмом (при агробактериальной трансформации), длительное культивирование *in vitro*, собственно трансгенез, т.е. инсерция Т-ДНК в геном растения-реципиента.

Случайное и ненаправленное встраивание чужеродной ДНК сопровождается каскадом изменений в геноме трансформируемых растительных эксплантов. По последним данным,

встраивание любых фрагментов Т-ДНК, даже если нарушена ее структура, приводит к изменениям в геноме растения-хозяина [14].

В ответ на любой вид стресса у растения происходит активация окислительных ферментов, что может стать причиной целого спектра изменений в ДНК [15]. При анализе первичных трансформантов льна на устойчивость к глифосату Н. Jordan и А. McNughen впервые обнаружили растения, приспособившиеся к существованию на селективной среде, но не содержащие в своем геноме чужеродной ДНК [16]. Такие растения были названы “escapes” или «ложными трансформантами». Можно предположить, что «ложные трансформанты», выжившие под влиянием многих стрессовых факторов, обладают повышенной физиологической «подвижностью» и «пластичностью», расширяют спектр генетической изменчивости и могут быть полезны для создания форм с ценным сочетанием признаков.

Цель данной работы состояла в проведении молекулярно-генетического анализа с помощью различных маркерных систем соматоклональных линий льна-долгунца («ложных трансформантов»), которые были получены как побочный эффект агробактериальной и биобаллистической трансформации растений двух сортов льна-долгунца Белита и Василек.

Материалы и методы

В качестве материала для исследований использованы четыре линии «ложных трансформантов» (EsB-1, EsV-1, EsV-2, EsV-3), полученные ранее в ходе экспериментов по генетической трансформации сортов льна-долгунца белорусской селекции Белита и Василек [17].

Выделение ДНК проводили как из индивидуальных растений, так и из общей выборки растений одной формы с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя.

Реакционная смесь для амплификации с IRAP-праймерами объемом 25 мкл содержала 1х ПЦР-буфер, по 0,5 пмоль каждого праймера, 0,25 мМ dNTP mix, 2 мМ MgCl₂, 1 ед. Taq-полимеразы и 20 нг матричной ДНК. Для проведения IRAP-анализа использовались 6 праймеров [18, 19]. ПЦР проводили на амплификаторе BioRad. Программа для ампли-

фикации: 1 цикл – 95 °С 2 мин, 2–40 цикл – 30 с при 94 °С, 30 с при Tm – 51–59 °С (температура отжига зависела от используемого праймера) и 1 мин 30 с при 72 °С, 41 цикл – финальная элонгация при 72 °С в течение 7 мин.

Для RAPD-анализа использовали олигонуклеотидные праймеры серии UBC (University of British Columbia): 73, 101, 127, 153, 180, 239, 243, 244, 248, 292, 336, 337, 348, 365, 396, 417, 458, 499, 542, 569, 574, 586, 601, 731, 790. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 20 нг геномной ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 2,5 мМ MgCl₂ и 1,5 ед. Taq-полимеразы в инкубационном буфере. ПЦР проводили в следующих условиях: цикл 1 – 5 мин при 95 °С; циклы 2 – 35 (40), 1 (20 с) мин при 95 °С, 1 (20 с) мин при 30–36 °С и 2 (1 мин 20 с) мин при 72 °С; цикл 36 – 7 мин при 72 °С.

Реакционная смесь для ISSR-анализа объемом 25 мкл содержала 20 нг матричной ДНК, 0,2 мкМ праймера, 0,25 мМ dNTP mix, 4 мМ MgCl₂, 1 ед. Taq-полимеразы. ПЦР проводили в следующих условиях: 1 цикл – 3 мин при 94 °С; циклы 2–35, 60 с при 94 °С, 30 с при 51–56 °С, 30 с при 72 °С, затем следовал финальный шаг – 3 мин при 72 °С. Для проведения данного анализа использовались 15 праймеров [18, 20].

Полученные продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле с добавлением этидиум бромид, документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc 2000. Размеры амплифицированных фрагментов определяли по маркеру молекулярной массы 100 bp (Thermo Scientific) или 1 kb DNA ladder (BRL).

Результаты и обсуждение

Изучение соматоклональной изменчивости может представлять интерес как в фундаментальных исследованиях в качестве модели эволюции и дивергенции генов в популяции, так и в практической селекции как доступный источник генетического разнообразия. С этой целью используют комплексный подход, включающий различные методы изучения и анализа.

При морфологическом анализе растений-регенерантов можно обнаружить лишь те изменения, которые имеют фенотипическое проявление. Анализ генетических ресурсов

растений с использованием молекулярных маркеров позволяет выявлять скрытую изменчивость и тем самым целенаправленно подходить к более точной дифференциации и идентификации коллекционных образцов, в том числе и выявлению ценных генотипов.

На сегодняшний день одним из наиболее доступных и быстрых способов обнаружить вариабельность, а затем выяснить природу соматической изменчивости является применение молекулярных методов, основанных на полимеразной цепной реакции и создание с их помощью маркеров ДНК, отличающих соматические клоны от исходного генотипа. Генетическая природа соматических изменений может быть успешно установлена с помощью различных маркерных систем анализа ДНК.

RAPD-анализ, ISSR-анализ достаточно часто используются для исследований соматической изменчивости [21–25].

Sala et al. использовали RAMP вместе с RAPD, AFLP и SSR для анализа трансгенных растений *Oriza sativa* L., *Populus*, *Saccharum officinarum* L., полученных посредством культуры клеток и трансгенного *Arabidopsis thaliana* L., полученного с помощью методики «макания цветка». Авторы обнаружили полиморфизм во всех исследуемых популяциях, причем вариации спектров амплификации наблюдались как у регенерантов, отличающихся по морфологическим признакам от исходного растения, так и у регенерантов, внешне идентичных исходному генотипу. В результате авторы пришли к выводу, что причиной полиморфизма среди трансгенных растений может быть как соматическая изменчивость, так и реакция на введение чужеродных генов [21].

На примере выращиваемых в культуре *in vitro* в течение двух лет каллусов сахарного тростника было показано, что RAPD-спектры таких регенерантов значительно более полиморфны, чем спектры регенерантов, полученных из молодых эмбриональных культур [23]. Для каллусной ткани солодки голой, длительно культивируемой в условиях *in vitro* (10 лет), RAPD-метод показал изменения в тотальной ДНК, а ПДРФ-анализ обнаружил полиморфизм в профилях митохондриальной ДНК [24]. Аналогичный метод был успешно использован для выявления полиморфизма соматических клонов персика, регенерированных из эмбриональной

культуры [25]. Для исследования географического распространения и полиморфизма каннабиса [27], а также для оценки уровня генетического разнообразия сортов льна и ландрас [26] был применен RAPD-анализ.

Включенные в наше исследование линии растений «ложных трансформантов» льна-долгунца, имеющие фенотипические различия по общей высоте растения, технической длине и др., отличались по RAPD-спектрам между собой и от родительских сортов. Три RAPD-праймера (UBC 542, UBC 574, UBC 731) из 25 включенных в исследование зафиксировали полиморфизм (рис. 1), который проявился и в возникновении новых неродительских RAPD-фрагментов, и в потере родительских фрагментов ДНК. Всего с использованием этих трех праймеров было амплифицировано около 145 локусов, из них 76 оказались полиморфными, что составило 52,4%. Размер амплифицируемых фрагментов – от 200 до 2000 п.н. Наибольшая степень полиморфизма, по данным RAPD-анализа, обнаружена у линий EsB-1, EsV-3.

В работах по исследованию регенерантов из каллусной культуры риса (*Oryza sativa* var. *indica*) RAPD-анализ применялся для маркирования 8-ми соматических семей растений, имеющих фенотипические различия, такие как повышенная засухоустойчивость, измененная биомасса, длина стебля и др., а также 4-х соматических семей, не отличающихся по фенотипическим признакам от родительской формы. Показано, что все анализируемые растения значительно отличались по своим спектрам ДНК как между собой, так и от родительских растений: 28 из 45 амплифицированных RAPD-фрагментов у соматических клонов были полиморфными, включая потерю родительских фрагментов ДНК и возникновение новых, неродительских RAPD-фрагментов [28].

Аналогичные исследования были проведены на соматических вариантах гороха (*Pisum sativum*). RAPD-анализ исходного сорта и его стабильных соматических регенерантов выявил полиморфизм ДНК как между соматическими клонами, так и между соматическими клонами и исходным сортом гороха. Степень различий между сортами была сравнима со степенью межсортовой дивергенции. При этом выявлен специфический фрагмент ДНК, характерный только для спектров регенерантов и отсутствующий в RAPD-спектре исходного сорта [29].

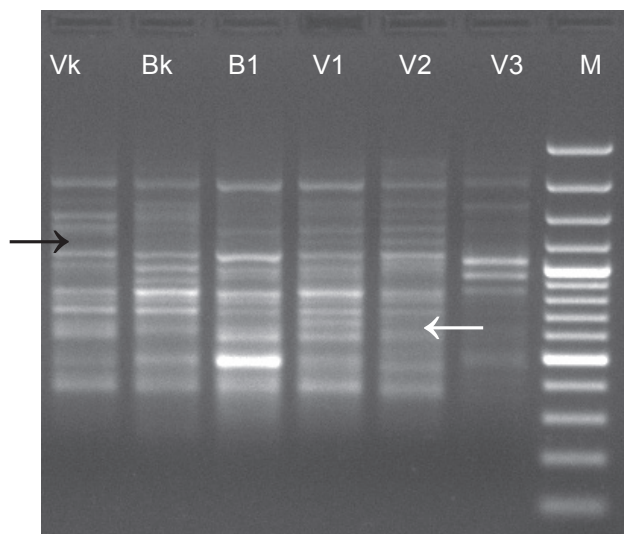


Рис. 1. RAPD профили амплификации ДНК исходных сортов Белита (B(k)), Василек (V(k)) и линий растений «ложных трансформантов» с праймером UBC 542

ISSR-метод, по мнению некоторых авторов, обладает большей воспроизводимостью по сравнению с RAPD [30]. С помощью RAPD-и ISSR-анализа были обнаружены изменения ДНК у соматоклонов гороха [31].

В нашей работе было использовано 15 ISSR-праймеров, три из них (UBC 811, UBC 835, UBC 809) выявили полиморфизм ДНК как между линиями растений «ложных трансформантов», так и отличие от родительских сортов. Полиморфизм ДНК, как и в случае использования RAPD-праймеров, проявился в возникновении новых, неродительских фрагментов и потере родительских фрагментов ДНК (рис. 2). Всего

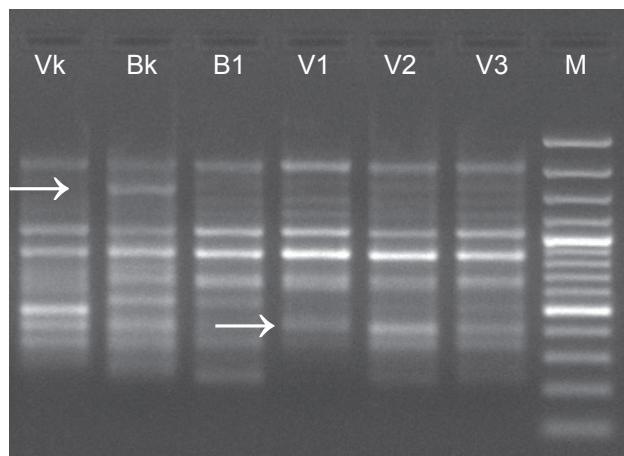


Рис. 2. ISSR-профили амплификации ДНК исходных сортов Белита (B(k)), Василек (V(k)) и линий растений «ложных трансформантов» с праймером UBC 835

амплифицировано 130 локусов, 34 из которых оказались полиморфными, что составило 26%. Размер амплифицируемых фрагментов – от 250 до 2500 п.н.

Наибольшая степень полиморфизма по данным ISSR-анализа обнаружена у линии EsV-1.

Метод микросателлитного анализа широко применяется для анализа полиморфизма близкородственных генотипов. Для выявления возможных изменений в геноме растений «ложных трансформантов» проведен SSR-анализ внутрелинейного и межлинейного ДНК-полиморфизма. Молекулярно-генетический анализ с помощью 10 информативных праймеров [32, 33] не обнаружил различий между индивидуальными растениями внутри линий «ложных трансформантов», что подтвердило генетическую однородность данных форм. При сравнении микросателлитных профилей амплификации линий «ложных трансформантов» и контрольных сортов установлен полиморфизм по шести локусам Lu2, Lu13, Lu17, Lu21, Lu23, Lu28, при этом обнаружены отличия аллельного состава как между линиями, так и между линиями и контрольными сортами [34]. Подавляющая доля мутаций в микросателлитных локусах возникает за счет специфической ошибки репликации ДНК в районе микросателлита – проскальзывания (англ. slippage), что приводит к появлению аллеля нового размера. В то же время часть микросателлитных мутаций может изменять количество повторов как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения (на два и более повторов). Мутационные изменения, затрагивающие размеры микросателлитных кластеров и число микросателлитных звеньев, изменяют такие важные молекулярно-биологические и биохимические характеристики как нуклеотидный состав, GC-содержание локусов, энергию Гиббса образования ДНК/ДНК-дуплекса, соотношение молекулярных масс 5'-3' и 3'-5' последовательностей. Полиморфизм микросателлитной ДНК установлен у образцов популяции EsV-2 и EsB-1 по локусу Lu23, у образцов популяции V-3 – по локусам Lu13, Lu23 [17].

IRAP – метод амплификации геномной ДНК между близкорасположенными последовательностями ретротранспозонов. Для генотипирования этих последовательностей

используют специально сконструированные праймеры RawS. Первоначально с помощью данных праймеров выявляли умеренные повторы ДНК ржи – семейство R173. Позднее было установлено, что данное семейство умеренно повторяющихся последовательностей имеется и в других видах растений – у картофеля, риса, пшеницы, а продукт ПЦР-амплификации геномной ДНК является стабильным генетическим IRAP-маркером. Полиморфизм в данном случае обусловлен либо мутацией в участке связывания праймера, либо уникальным биологическим процессом – ретротранспозицией, в результате встраивания ретротранспозона в новый участок геномной ДНК без потери первоначального участка [35–41].

Полиморфизм линий «ложных трансформантов» льна-долгунца установлен с помощью пяти IRAP-праймеров из семи, взятых в исследование. Всего было амплифицировано 238 локусов, из них 58 оказались полиморфными, что составило 24,4%. Полиморфизм, выявленный с помощью праймеров 1833, 1899, 1854 и 1845, составил 30, 30, 24 и 37 локусов, 1826, 1846 и IRAP – 43, 44 и 30 соответственно. Размер амплифицируемых фрагментов не превышал 2000 п.н. Максимальный уровень вариабельности показан для праймера 1826. Обнаружены отличия как между родительской формой и линиями, так и межлинейный полиморфизм. Линия EsB-1 отличалась от исходного сорта Белита по семи полиморфным локусам, у линии EsV-1 в отличие от исходного сорта Василек было выявлено 11 полиморфных фрагментов, у линии EsV-2 – 7 полиморфных фрагментов, у линии EsV-3 – 10 полиморфных фрагментов по сравнению с исходным сортом.

Метод REMAP аналогичен IRAP-методу, но вместе с праймерами к ретротранспозонам используются микросателлитные праймеры – двух-, трех- или четырехбазовые, например, (NN)n, (NNN)n или (NNNN)n [42, 43]. REMAP-анализ линий «ложных трансформантов» выявил меньшее количество полиморфизмов по сравнению с IRAP-анализом. Из восьми использованных в исследовании праймеров только 4 установили различия. Линия EsB-1 отличалась от кон-

трольного исходного сорта Белита по амплификации с праймерами IRAP+UBC807, IRAP+UBC808, IRAP+UBC811. Выявлено 4 полиморфных локуса. Линия EsV-1 отличалась от исходного сорта Василек по амплификации с праймерами IRAP+UBC807, IRAP+UBC809. Выявлено 2 новых фрагмента по сравнению с ПЦР-продуктом исходного сорта. Линии EsV-2, EsV-3 не отличались от исходного сорта Василек по продуктам амплификации с использованными REMAP-праймерами. Наибольшая степень полиморфизма по данным REMAP-анализа обнаружена у линии EsB-1.

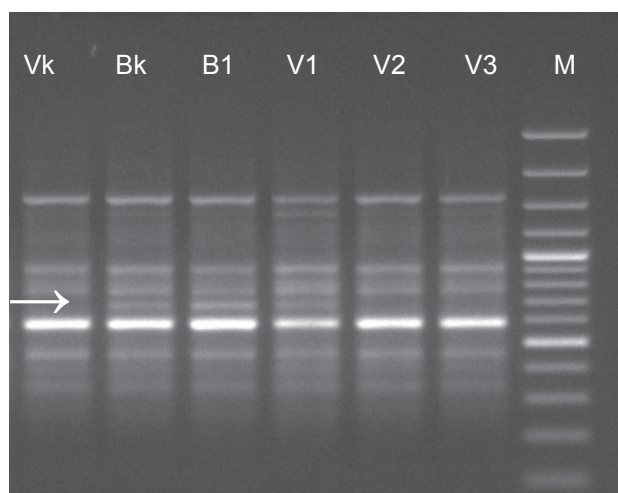


Рис. 3. IRAP-профили амплификации ДНК исходных сортов Белита (B(k)), Василек (V(k)) и линий растений «ложных трансформантов» с праймером 1846

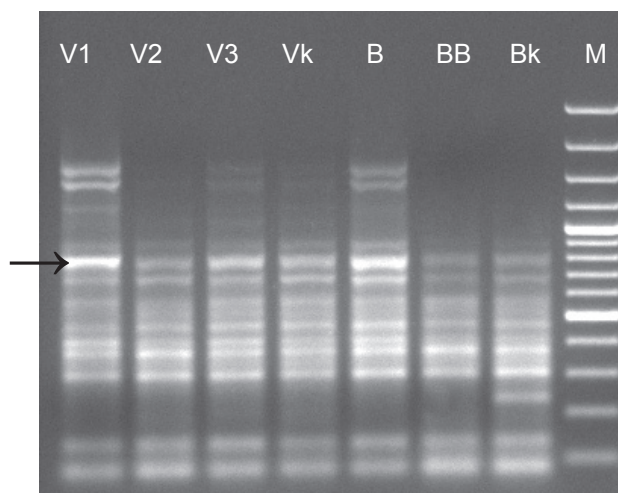


Рис. 4. REMAP-профили амплификации ДНК исходных сортов Белита (B(k)), Василек (V(k)) и линий растений «ложных трансформантов» с REMAP-праймерами IRAP и UBC 811

Заключение

Стрессовое воздействие является механизмом, запускающим процессы, вызывающие резкий рост числа мутаций и других геномных перестроек. Сохранение клетками генетической стабильности может рассматриваться лишь как исключение. В клетках растений, культивируемых *in vitro*, происходят генные мутации, частота которых достаточно велика и может быть использована для повышения генетического разнообразия культивируемых растений. Проведенный молекулярно-генетический анализ с помощью RAPD-, ISSR-, SSR-, IRAP-, REMAP-маркеров позволил зафиксировать изменения в геноме потомства растений «ложных трансформантов» льна-долгунца и выявить отличия их генетической структуры от исходных форм. Наибольший полиморфизм выявлен у линии EsB-1, созданной на основе растения, прошедшего процедуру агробактериальной генетической трансформации. Можно предположить, что такие этапы данной методики, как длительное культивирование в условиях *in vitro* и контакт с патогенным микроорганизмом, приводят к усилению геномной изменчивости.

Изучение полиморфизма ДНК с использованием нового типа молекулярно-генетических маркеров, основанных на изучении фрагментов ДНК, фланкированных участком фланга ретротранспозона и его инвертированным повтором, представляет интерес в плане генотипирования растений. Исходя из полученных данных, IRAP-анализ наиболее эффективен для выявления соматоклональной изменчивости у растений «ложных трансформантов» льна-долгунца.

Таким образом, геном реагирует на повреждающие (стрессовые) воздействия включением геномных же механизмов, приводящих к реконструкции генома клетки. Значительная часть возникших в результате этого изменений может иметь адаптивное значение, поэтому растения «ложные трансформанты», выжившие под влиянием многих стрессовых факторов, по-видимому, обладают повышенной физиологической «подвижностью» и «пластичностью», расширяют спектр генетической изменчивости и могут быть полезны для создания форм с ценным сочетанием признаков.

Список использованных источников

1. Walbot, V. The plasticity of the plant genome – is it a requirement for success? / V. Walbot, C. Cullis // Plant Mol. Biol. Rep. – 1983. – Vol. 1. – P. 3–11.
2. Associated nuclear changes in the induction of flax / G.M. Evans [et al.] // Nature. – 1966. – Vol. 212. – P. 697–699.
3. Cullis, C.A. DNA sequence organization in the flax genome / C.A. Cullis // Biochimica et Biophysica Acta. – 1981. – Vol. 652, N 1. – P. 1–15.
4. RAPD polymorphism detected among the flax genotypes / C.A. Cullis [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1999. – Vol. 41, N 6. – P. 795–800.
5. Durrant, A. An unstable gene in flax / A. Durrant, D.B. Nicholas // Heredity. – 1970. – Vol. 25, N 4. – P. 513–527.
6. Organization of the 5S RNA genes in flax / P.B. Goldsbrough [et al.] // Nucl. Acids Res. – 1981. – Vol. 9, N 22. – P. 5895–5904.
7. Генотипическая гетерогенность по устойчивости к стрессовым факторам в культуре гипокотильных сегментов льна (*Linum usitatissimum* L.) / И.В. Ущаповский [и др.] // Проблемы повышения технологического качества льна-долгунца: Мат. междунар. научно-практич. конф. Торжок, 2-3 ноября 2004г. / ВНИИЛ. – Торжок, 2005. – С. 123–130.
8. Somaclonal variation in *Linum usitatissimum* L. / G. Marshall [et al.] // Flax as a fibre and oil bearing crop: Proceedings European Regional Workshop on Flax, Brno, Czechoslovakia, 18-20 June, 1991. – Brno, 1991. P. 143–154.
9. A tissue culture derived salttolerant line of flax (*Linum usitatissimum*) / A. McHughen [et al.] // J. Plant Physiol. – 1984. – Vol. 117, № 2. – P. 109–117.
10. Differential stress tolerance and cross adaptation in a somaclonal variant of flax / B.J. O'Connor [et al.] // J. Plant Physiol. – 1991. – Vol. 139, № 1. – P. 32–36.
11. Selection of chlorsulfuronresistance in flax (*Linum usitatissimum*) cell cultures / M.C. Jordan [et al.] // J. Plant Physiol. – 1987. – Vol. 133. – P. 333–338.
12. Поляков, А.В. Биотехнология в селекции льна / А.В. Поляков // Тверь. – 2000. – 180 с.
13. Виноградова, Е.Г. Возможность получения методами клеточной селекции форм льна-долгунца, устойчивых к токсичным

- ионам алюминия / Е.Г. Виноградова // Научные достижения – льноводству: Мат. научно-практич. конф., посвящ. 80-летию ВНИИ льна. / ВНИИЛ. – Торжок, 2010. – С. 147–150.
14. Т-ДНК-индуцированные мутации у трансгенных растений / Е.В. Дейнеко [и др.] // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 1, – С. 5–17.
15. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures / T. Gaspar [et al.] // J. Plant Growth Regulation. – 2002. – Vol. 37. – P. 263–285.
16. Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots / M. Jordan [et al.] // Plant Cell Rep. – 1988b. – Vol. 7, N 4. – P. 285–287.
17. Генетическая трансформация льна / В.А. Лемеш [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2014. – Т. 18. – С. 20–30.
18. Variability of *Linum usitatissimum* L. based on molecular markers / J. Ziarovska [et al.] // ARPN Journal of agricultural and biological science. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. 50–58.
19. Retrotransposon-based molecular markers for analysis of genetic diversity within the genus *Linum* / N.V. Melnicova [et al.] // BioMed Research International. – Vol. 2014. – 14 p.
20. Relatedness of Indian Flax Genotypes (*Linum usitatissimum* L.): An Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Primer Assay / Ashwini V. Rajwade [et al.] // Mol Biotechnol. – 2010. – Vol. 45. – P. 161–170.
21. Somaclonal variation in transgenic plants / F. Sala [et al.] // Acta Hort. – 2000. – Vol. 530. – P. 411–419.
22. RFLP analysis of *Zea mays* callus cultures and their regenerated plants / P.T.H. Brown, E. Gobel, H. Lorz // Theor. Appl. Genet. – Vol. 81. – P. 227–232.
23. The development of sequence-tagged sites (STSs) in *Lolium perenne* L.: the application of primer sets derived from other genera. / C. Taylor [et al.] // TAG. – 2001. – Vol. 103. – P. 648–658.
24. Чибиряев, С.В. Влияние длительно-го культивирования *in vitro* на морфофизиологические характеристики и генетическую стабильность линий каллусной ткани солодки голой : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.12 / С.В. Чибиряев; Изд-во Баш. гос. ун-та. – Уфа, 2002. – 19 с.
25. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach / G. Hashmi [et al.] // Plant Cell Reports. – 1997. – Vol. 16. – P. 624–627.
26. Analysis of 54 North American Flax Cultivars / Y.B. Fu [et al.] // Crop Science. – 2003. – Vol. 43, N 4. – P. 1510–1515.
27. Geographic patterns of RAPD variation in cultivated flax / Y.B. Fu // Crop Science. – 2005. – Vol. 45, N 3. – P. 1084–1089.
28. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. *indica*) somaclonal progenies. / I.D. Godwin [et al.] // Plant Cell Reports. – 1997. – Vol. 16. – P. 320–324.
29. RAPD-анализ соматоклональной и межсортной изменчивости гороха. / З.Г. Кокаева [и др.] // ДАН. – 1997. – Т. 355, № 1. – С. 134–136.
30. Определение генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Lycopersion* (Tourn) Mill методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR) / Е.З. Кочиева [и др.] // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 8. – С. 1133–1142.
31. Кузнецова, О.И. Молекулярно-генетический анализ растений-регенерантов, полученных из длительно культивируемых каллусов гороха : автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / О.И. Кузнецова; МГУ им. М.В. Ломоносова – М., 2005. – 19 с.
32. Polymorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum* / C. Roose-Amsaleg [et al.] // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 796–799.
33. Межсортной полиморфизм геномов льна (*Linum usitatissimum* L.) по молекулярно-цитогенетическим маркерам / О.А. Рачинская [и др.] // Генетика. – 2011. – Т. 47, № 1. – С. 1–11.
34. Гузенко, Е.В. Морфо-генетический полиморфизм популяций льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), сформированных на основе ложных трансформантов / Е.В. Гузенко, В.А. Лемеш, М.В. Богданова // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2012. – Т. 13. – С. 1–14.
35. Боронникова, С.В. Использование IRAP-метода для анализа генетической изменчивости популяций ресурсных и редких видов растений. / С.В. Боронникова, Р.Н. Календарь // Генетика. – 2010. – Т. 46. – № 1. – С. 44–50.

36. Боронникова, С.В. Генетическая паспортизация популяций редких видов растений рода *Adonis* с использованием ISSR- и IRAP-маркеров / Боронникова С.В. // Известия ТСХА. – 2009. – № 1. – С. 83–89.
37. Rogowsky, P.M. Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences / P.M. Rogowsky, K.W. Shepherd, P. Langridge // Genome. – 1992. – Vol. 35. – P. 621–626.
38. Хавкин, Э.Е. ДНК генотипирование растений *Brassica* и *Solanum* / Э.Е. Хавкин // 3 Моск. Межд. Конгресс Биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2007. – С. 304.
39. Kumar, A. Plant retrotransposons / A. Kumar, J. Bennetzen // Annual Rev. Genetics. – 1999. – Vol. 33. – P. 479–532.
40. Евгеньев, М.Б. Мобильные элементы и эволюция генома / М.Б. Евгеньев // Молекулярная биология. – 2007. – Т. 41. – № 2. – С. 234–245.
41. Guidet, F. Cloning and characterization of a new rye-specific repeated sequence / F. Guidet, P. Rogowsky, C. Taylor // Genome. – 1991. – Vol. 34. – P. 81–87.
42. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques / R. Kalendar [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 1999. – Vol. 98. – P. 704–711.
43. Kalendar, R. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting / R. Kalendar, A.H. Schulman // Nature Protocols. – 2006. – Vol. 1, N 5. – P. 2478–2484.

V.A. Lemesh, E.V. Guzenko, E.V. Zheleznyakova

GENETIC POLYMORPHISM OF FLAX (*LINUM USITATISSIMUM* L.) “ESCAPES” LINES

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

Stress exposure is the mechanism that initiates the processes leading to a sharp increase in the number of mutations and other genomic rearrangements. Gene mutations occur in the plant cells cultivated *in vitro*, their frequency is quite high and can be used to increase the genetic diversity of cultivated plants. The molecular genetic analysis carried out by RAPD-, ISSR-, SSR-, IRAP-, REMAP-markers allowed to identify changes in the genome of the offspring plants of “escapes” of fiber flax, and differences in their genetic structure of the original forms.

Key words: flax, escapes, somaclonal variation, molecular markers.

Дата поступления статьи 13 сентября 2016 г.

О.А. Орловская, С.И. Вакула, Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ЗАПАСНЫХ УГЛЕВОДОВ В ЭНДОСПЕРМЕ ОБРАЗЦОВ РАЗЛИЧНЫХ ПОДВИДОВ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS* L.)

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

Проведен анализ содержания крахмала, амилозы, амилопектина и растворимых сахаров в эндосперме 53 образцов кукурузы 5 подвидов (зубовидная, полужубовидная, кремнистая, сахарная, восковидная). Показано, что исследованные подвиды значительно отличаются по уровню накопления основных запасных углеводов. Выделены генотипы с высоким содержанием крахмала, растворимых сахаров и амилопектина, которые представляют интерес для селекционных программ кукурузы, направленных на повышение качества зерна.

Ключевые слова: кукуруза (*Zea mays* L.), подвиды кукурузы, качество зерна, запасные углеводы эндосперма.

Введение

Кукуруза (*Zea mays* L.) является одной из наиболее востребованных сельскохозяйственных культур, мировое производство которой с 2004 по 2014 год увеличилось с 600 до 992 млн т [1]. Одним из факторов, способствующих широкому распространению кукурузы, является глобальное потепление, из-за которого погодные условия становятся все более благоприятными для ее возделывания. Например, в Европе повышение среднегодовой температуры на 1 °C отодвинуло границу распространения кукурузы на 200 км к северу [1]. Происходящие изменения климата способствуют расширению ареала культивирования кукурузы и в Республике Беларусь. В нашей стране кукуруза главным образом представляет интерес для производства зернофуража, поскольку по урожайности она превышает все зерновые культуры, а по содержанию кормовых единиц превосходит овес, ячмень и рожь. Кроме того, растет интерес к использованию кукурузы и в качестве сырья для промышленной переработки. Требования к качеству зерна зависят от его назначения: для крупяной промышленности, мукомольной, крахмалопаточной, предприятий торговли и общественного питания, для выработки комбикормов [2]. В Беларуси зерно кукурузы заготавливают в первую очередь для переработки на крахмал, который получают из сортов с мучнистым, рыхлым эндоспермом и с низким содержанием белка. Значение при определении пригодности зерна кукурузы для переработки на крахмалопа-

точных комбинатах имеют физические свойства зерна – его удельный вес, крупность, ломкость, повреждение при нагревании, набухаемость и объем пор. Из химических показателей большой интерес представляют содержание крахмала и жира, как наиболее устойчивые характеристики [3]. Для качества самого крахмала важную роль играет его способность клейстеризоваться, что зависит от соотношения в нем амилозы и амилопектина. Таким образом, для создания сортов кукурузы с комплексом признаков, отвечающих требованиям перерабатывающих предприятий, наряду с агрономическими и технологическими большую роль играют биохимические признаки. Цель нашего исследования – выделение хозяйственно-ценных генотипов кукурузы на основе оценки содержания основных запасных углеводов в эндосперме образцов различных подвидов.

Материалы и методы

В исследовании использовали коллекцию из 53 генотипов кукурузы, включающую 20 самоопыленных линий селекции РНДУП «Полесский институт растениеводства» (Гомельская обл., Беларусь), 25 образцов селекции России, США из коллекции ГНУ «Всероссийский институт растениеводства» (г. Санкт-Петербург, Россия), 8 образцов с мутантными аллелями генов *wx1*, *ae1*, *sh1*, играющих ключевую роль в биосинтезе крахмала, из Maize Genetics Cooperation Stock Center (USA). В данной коллекции представлены образцы 5 подвидов кукурузы: 15 образцов восковид-

ной кукурузы (*Zea mays ceratina*), 13 – зубовидной (*Zea mays indentata*), 10 – сахарной (*Zea mays saccharata*), 8 – кремнистой (*Zea mays imdurata*), 7 – полужубовидной (*Zea mays semidentata*).

Содержание крахмала и растворимых сахаров определяли согласно ГОСТ 10845-98 с модификациями [4] и ГОСТ 5903-89 п. 6.2 «бихроматный метод» [5] соответственно. Крахмал извлекали из муки, применяя метод, предложенный Knutson [7]. Содержание полисахаридов крахмала (амилозы и амилопектина) рассчитывали по Hoverkamp-Hermelink с соавт. [6].

Для статистической обработки данных использовали программный пакет Statistica 10.0 для Windows.

Результаты и обсуждение

В последнее время со стороны перерабатывающего комплекса и потребителя возрастает интерес к кукурузе «нетрадиционного» использования (сахарной, восковидной, крахмалистой, высокоамилозной, лопающейся, белозерной, высокомасличной, высокобелковой и др.). В данной работе проведен анализ содержания крахмала, амилозы, амилопектина и растворимых сахаров в эндосперме 53 образцов кукурузы 5 подвидов.

Содержание крахмала в изученном материале варьировало от 39,60% до 94,58% и в среднем составило 72,79%. Выделено 19 образцов, содержание крахмала которых было на высоком уровне и превышало 80%, из них 11 – линии белорусской селекции. Кроме того, еще у 18 образцов содержание крахмала составило 70–80%. Это главным образом генотипы из коллекции ВИР и Maize Genetics Cooperation Stock Center. Минимальное значение признака характерно для образца сахарной кукурузы Howling Mob – 39,60%. Коэффициенты вариации и осцилляции для содержания крахмала в эндосперме 53 образцов кукурузы составили 21,05% и 73,06%, соответственно.

Более широкий диапазон изменчивости выявлен для содержания растворимых сахаров в эндосперме (0,04–29,88%), при среднем значении признака 7,11%. Коэффициент вариации признака в коллекции составил 98,59%, коэффициент осцилляции – 420,25%. В зерне отдельных образцов данный показатель не превышал 0,1% (ДК 744, К 410, Кос 1/07, 517В ae1[^]w64A). Высокий уровень сахаров отмечен для 10 geno-

типов из коллекции ВИР (Country Gentlemen, 5010, Golden Bantam, Black Mexican, Golden Bantam-2, Early June, Burbank Early, Black Mexican-2, Howling Mob, Golden Evergreen) – от 12,72% до 29,88%. Высокое значение по данному признаку установлено также для линии белорусской селекции БЛ 615/95 – 13,67%.

Крахмал представляет собой смесь двух полисахаридов – амилозы и амилопектина, различающихся строением цепи молекулы. По данным рентгеноструктурного анализа амилоза состоит из неразветвленных цепей, которые включают до 4000 звеньев D-глюкозы, соединенных α 1,4-гликозидными связями. Амилопектин – полисахарид разветвленного строения (примерно 30 ответвлений в молекуле). Внутри каждой цепи звенья D-глюкозы соединены α 1,4-гликозидными связями, как в амилозе, но длина полимерных цепей варьирует от 24 до 30 глюкозных единиц. В местах разветвлений новые цепи присоединяются посредством 1,6-гликозидных связей. Наибольшую практическую ценность представляет крахмал восковидной кукурузы с высоким содержанием амилопектина. Так, восковидный крахмал имеет более высокую вязкость, относительно низкую температуру клейстеризации, водные растворы такого крахмала более прозрачны и имеют тянущуюся консистенцию [8].

У изученных образцов содержание амилопектина варьировало от 71,69% до 99,81% (коэффициент вариации составил 11,43%), диапазон изменчивости содержания амилозы – 0,19–28,31% (коэффициент вариации – 55,17%). Для обоих признаков характерно бимодальное распределение. Первая вершина соответствует образцам кукурузы, накапливающим около 24% амилозы и 76% амилопектина. Такие генотипы представлены образцами зубовидной кукурузы коллекции ВИР, линиями белорусской селекции. Наиболее высокая концентрация амилозы (более 26%) отмечена в зерне образцов зубовидной кукурузы БЛ 365, БЛ 990 селекции Полесского института растениеводства. Второй максимум составляют образцы восковидной кукурузы, содержание амилозы в крахмале которых составляет менее 2% (соответственно амилопектина более 98%). Это линии АД142, АД174, АД117, АД1-4480, АД37 коллекции ВИР и образцы 909D clsh1wx, 1915A wx1[^]w64A, 915A wx1[^]oh43, предоставленные Maize Genetics Cooperation Stock Center.

Для оценки связи между накоплением различных классов запасных углеводов в эндосперме кукурузы использовали непараметрический корреляционный анализ Спирмена. Между накоплением крахмала и растворимых сахаров в зерне кукурузы показана тесная обратная корреляционная зависимость ($r = -0,6$). Связь между уровнем накопления раство-

римых сахаров и концентрацией в крахмале амилопектина/амилозы достоверная, но слабая: прямая для уровня амилопектина ($r = 0,3$), и обратная – для амилозы ($r = -0,3$).

Согласно результатам дисперсионного анализа, исследованные подвиды кукурузы значительно отличаются по уровню накопления запасных углеводов в эндосперме (табл.).

Однофакторный дисперсионный анализ содержания запасных углеводов в эндосперме различных подвидов кукурузы

Фактор	DF	Растворимые сахара		Крахмал		Амилоза		Амилопектин	
		SS	MS	SS	MS	SS	MS	SS	MS
Подвид	4	34465,79	8616,45**	110167,00	27542,00**	64654,00	16163,00**	64653,60	16163,40**
Ошибка	844	7280,44	8,63	62259,00	74,00	10297,00	12,00	10297,40	12,20

** – значимо при $\alpha \leq 0,01$

Уровень накопления крахмала возрастает в ряду «сахарная, зубовидная, восковидная, кремнистая, полужубовидная кукуруза» (рис. 1). Содержание крахмала в эндосперме сахарной кукурузы достоверно ниже, чем у других подвидов. Можно отметить, что для всех изученных подвидов характерна значительная вариабельность данного признака (рис. 1). Высоким содержанием сахаров отличаются образцы сахарной кукурузы (рис. 1). Генотипы дефицитной по амилозе восковидной кукурузы накапливают более 5% растворимых сахаров. Различия средних значений признака между подвидами зубовидной, полужубовидной и кремнистой кукурузы статистически недостоверны; для всех трех групп содержание растворимых сахаров в зерне составляет около 3–4%. Можно отметить, что для подвидов сахарной и кремнистой кукурузы выявлена высокая вариация признака: 39,47% (Howling Mob) – 60,53% (Early June) и 1,38% (линия БЛ22) – 13,67% (линия БЛ 615/95) соответственно.

Восковидная кукуруза характеризуется двухслойностью эндосперма. Наружная часть его непрозрачна и по виду напоминает воск, но по твердости не уступает стекловидному эндосперму лопающейся кукурузы. Внутренний слой эндосперма – мучнистый. Крахмал эндосперма состоит почти на 100% из амилопектина, обладающего сильной клейкостью. Исследованные образцы восковидной кукурузы значительно превышают по содержанию амилопектина

остальные подвиды кукурузы. Содержание этого полисахарида в 36 раз превышает уровень накопления амилозы у данных генотипов (рис. 1). В крахмале сахарной кукурузы уровни накопления полисахаридов амилоза:амилопектин соотносятся как 1:4, в крахмале зубовидной, полужубовидной и кремнистой кукурузы – примерно 1:3, что соответствует составу кукурузного крахмала большинства коммерческих образцов.

Для классификации образцов коллекции кукурузы по комплексу признаков содержания запасных углеводов использовали метод главных компонент (Principal Component Analysis, PCA), результаты которого представлены на рис. 2. Первые два главных компонента (фактор 1 и фактор 2) определяют соответственно 54% и 46% общей изменчивости по четырем изученным признакам. Проекция признаков «амилоза, %» и «амилопектин, %» на плоскость главных компонент образует более длинный вектор и меньший угол наклона с фактором 1. Таким образом, изменчивость вдоль данного фактора преимущественно определяется изменением соотношения амилоза:амилопектин в крахмале. Более высокий вклад в изменчивость, определяемую фактором 2, вносят признаки «крахмал, %» и «растворимые сахара, %». Проецирование образцов на плоскость главных компонент позволило выявить генотипы кукурузы с комплексом признаков, отвечающим различным направлениям использования.

В левой верхней четверти графика расположены образцы восковидной кукурузы, характеризующиеся высокой концентрацией амилопектина в крахмале и повышенным уровнем растворимых сахаров в эндосперме. В правой верхней четверти графика находятся формы сахарной кукурузы, запасующие в эндосперме более 10% растворимых сахаров и менее 60% крахмала. Нижней правой четверти графика соответствуют образцы кремнистой, зубовидной и полужубовидной кукурузы, содержащие в крахмале более 20% амилозы. На левую нижнюю четверть графика спроецированы образцы, несущие мутации в генах биосинтеза крахмала – *ael* и *sh1*, а также образцы, несущие комбинации этих мутаций с рецессивным аллелем гена *waxy*, ответственным за формирование восковидного эндосперма.

Биохимический состав зерна кукурузы обуславливает направление хозяйственного использования данной культуры. Кукуруза, крахмал в зерне которой составляет более 80%, является ценным сырьем для крахмало-паточной промышленности. Зерно кукурузы с содержанием в нем крахмала на уровне 75–80% идет на производство круп, муки, спирта и корма для животных. Восковидная и сахарная кукуруза, благодаря высокому уровню растворимых сахаров в зерне, употребляется в пищу в свежем или консервированном виде на стадии молочной спелости. Кроме того, крахмал восковидной кукурузы состоит практически полностью из амилопектина, в то время как у остальных подвидов он содержит примерно 75% амилопектина и 25% амилозы. Восковидный крахмал отличается от обычного по физико-химическим и некоторым технологическим свойствам, которые определяются различием структуры их молекул. Крахмал восковидной кукурузы по своим свойствам ценнее крахмала других подвидов кукурузы, а по некоторым показателям превосходит картофельный крахмал. Его используют для быстрого приготовления пудингов, производства клея и других промышленных продуктов.

В результате изучения образцов кукурузы по содержанию запасных углеводов в эндосперме выделены 19 генотипов с высоким содержанием крахмала, 11 – растворимых сахаров, 8 – амилопектина, которые можно использовать для создания сортов, представляющих интерес для перерабатывающих предприятий различного профиля.

Заключение

Анализ содержания основных запасных углеводов в эндосперме 53 образцов 5 подвидов кукурузы показал, что исследованные подвиды значительно отличаются по уровню накопления крахмала, амилозы, амилопектина и растворимых сахаров. Содержание крахмала возрастает в ряду «сахарная, зубовидная, восковидная, кремнистая, полужубовидная кукуруза». Между накоплением крахмала и растворимых сахаров в эндосперме кукурузы имеется тесная обратная корреляционная зависимость ($r = -0,6$). Исследованные образцы восковидной кукурузы значительно превышают по содержанию амилопектина остальные подвиды кукурузы. Выделенные в результате исследования генотипы с высоким содержанием крахмала, растворимых сахаров и амилопектина представляют интерес для селекционных программ кукурузы, направленных на повышение качества зерна.

Список использованных источников

1. Рену, Ж.-П. Урожайность кукурузы будет расти. Почему? / Ж.-П. Рену // Белорусское сельское хозяйство. – 2015. – № 1 (153). – С. 49–51.
2. Новоселов, С.Н. Философия идеотипа сельскохозяйственных культур. II. Современные критерии идеальной модели пищевой кукурузы [Электронный ресурс] / С.Н. Новоселов. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2006/08/pdf/28.pdf>.
3. Шустова, Е.Н. Об оценке зерна кукурузы как сырья для пищевой промышленности / Е.Н. Шустова // Основные результаты научно-исследовательской работы по кукурузе. – Днепрпетровск: ВНИИК, 1971. – С. 323–328.
4. ГОСТ 10845-98 Группа С19. Межгосударственный стандарт зерно и продукты его переработки. Метод определения крахмала. ОКСТУ 9209, 9709 МКС 67.060. – Введ. 2000-01-01. // Зерно. Методы анализа: сб. ГОСТов. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2001.
5. ГОСТ 5903-89 Группа Н49. Межгосударственный стандарт изделия кондитерские. Методы определения сахара. ОКСТУ 9109. МКС 67.180.10 – Введ. 01.01.91 // Сахарные кондитерские изделия. Технические условия. Методы анализа: сб. ГОСТов. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2004. – 213 с.

6. Rapid estimation of the amylose/amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato / T.S. Hoverkamp-Hermelink [et al.] // *Potato Res.* – 1988. – № 31. – P. 241–246.

7. Knutson, C.A. Simplified colorimetric procedure for determination of amylase in maize starches / C.A. Knutson // *Cereal. Chem.* – 1986. – № 63. – P. 89–92.

8. Шорохов, В.В. Анализ химического состава зерна новых среднеспелых гибридов восковидной кукурузы / В.В. Шорохов, А.И. Сарбашева; Э.Б. Хатефов // Сб. научных трудов Международной научно-практической конференции «Золотое наследие академика ВАСХНИЛ М.И. Хаджинова», посвященной 110-летию со дня его рождения. – Краснодар: ООО Эдви, 2009. – С. 71–75.

O.A. Orlovskaya, S.I. Vakula, L.V. Khotyleva, A.V. Kilchevsky

ANALYSIS OF THE RESERVE CARBOHYDRATE CONTENT IN THE ENDOSPERM OF DIFFERENT MAIZE SUBSPECIES (*ZEA MAYS* L.)

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

Analysis of the starch, amylose, amylopectin and soluble sugars content in the endosperm of 53 maize samples of 5 subspecies (dent, semident, flint, sweet, waxy) was made. The tested subspecies significantly differ in the level of main reserve carbohydrates accumulation. Genotypes with high content of starch, soluble sugars and amylopectin were identified and can be used in the maize breeding programs for the improvement of grain quality.

Key words: maize (*Zea mays* L.), subspecies of maize, grain quality, reserve carbohydrates of endosperm.

Дата поступления статьи 5 сентября 2016 г.

И.С. Гордей

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНОМА РЖИ ПРИ ЗИГОТИЧЕСКОЙ ДУПЛИКАЦИИ

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

Изучены структурные изменения генома ржи в ранних поколениях (F_{3-6}) после зиготической дупликации. Показано, что дупликация генома ржи приводит к элиминации части ядерной ДНК у тетраплоидов, структурным изменениям ДНК в локусах запасных белков ржи *Sec-1* и *Sec-2*. Не выявлено замен, выпадений или вставок нуклеотидов в локусе β -амилазы *REMS1218* при дупликации генома ржи.

Ключевые слова: рожь, дупликация генома, тетраплоиды, диплоиды, молекулярный, генетический, ДНК, ядра, нуклеотиды

Введение

Кратное увеличение числа геномов (полиплоидия / дупликация генома) – широко распространенное явление среди эукариотических организмов и один из ключевых механизмов эволюции. В эволюции большинства высших растений полиплоидия сыграла решающую роль. Широкое распространение полиплоидных форм в природных популяциях и их значение для процессов видообразования установлено в настоящее время на большом и разнообразном фактическом материале.

Метод экспериментальной полиплоидии на современном этапе является одним из перспективных способов в селекции озимой ржи. Посевные площади под озимой рожью в Республике Беларусь составляют около 300 тыс. га, в том числе тетраплоидная рожь занимает 50%. Широкое распространение в нашей республике тетраплоидная рожь получила благодаря ряду преимуществ: более высокий потенциал продуктивности за счет увеличения массы 1000 зерен на 25–30%; более высокая устойчивость к полеганию за счет утолщения стебля и снижения его длины на 10–15%; содержание белка в зерне тетраплоидной ржи на 0,6–2,2% выше; у тетраплоидной ржи ниже содержание антипитательных веществ (5-алкилрезорцинолов); возможность использования зерна в хлебопечении и для приготовления кормов; более продолжительное сохранение гетерозиготности и эффекта гетерозиса в поколениях [1].

Исследования последних лет, проведенные с применением молекулярных технологий,

показали, что генезис полиплоидных форм сопровождается различными генетическими и эпигенетическими изменениями (межгеномные перестройки хромосом, элиминирование последовательностей, изменение экспрессии генов, активизация «дремлющих» транспозонов, метилирование ДНК и т.д.).

Геномное секвенирование позволило проанализировать последствия древних геномных дупликаций у самых разных групп эукариот, в том числе дрожжей [2, 3, 4], растений [5] и позвоночных [6]. Во всех четырех эукариотических царствах (растений, животных, грибов и протист) доля генов, сохранившихся в виде дублицированных копий, варьирует от 10 до 50% и чаще всего коррелирует со временем, прошедшим с момента дупликации [4].

Во многих случаях было обнаружено, что часть ДНК элиминирует с увеличением уровня плоидности. М. Бэннет с соавторами [7] в результате анализа 2452 видов покрытосеменных (1794 диплоида и 658 полиплоидов) обнаружил, что количество ДНК при дупликации генома не увеличивается прямо пропорционально увеличению уровня плоидности.

При дупликации генома обнаруживается функциональная диверсификация дублицированных генов. К. Вольф и Г. Бланк [8] в результате исследований, проведенных на *Arabidopsis*, установили, что около 62% пар дублицированных генов подверглись функциональному расхождению (функциональной диверсификации). У синтетического аутополиплоида *Isatis*

indigotica с помощью микроэлектронного ДНК выявлены изменения в экспрессии у 4,2% последовательностей ДНК по сравнению с диплоидами [9]. Дублицированные гены, вероятно, приобретают новую полезную для организма функцию посредством мутационной изменчивости.

При дупликации генома может происходить «замолкание» отдельных дублицированных генов (псевдогенизация). Широко известен пример псевдогенизации локуса лейцин-аминопептидазы в результате дупликации у тетраплоида *Chenopodium* [10]. Известен пример псевдогенизации *PGL*-генов у *Clarkia* и хлорофиллсвязывающих *a/b*-генов у *Polystichum munitum* при дупликации генома, что обусловлено многочисленными повреждениями «замолкших» генов, такими как точечные мутации, инсерции и делеции [11–15].

Активация мобильных элементов также может быть причиной геномных изменений, в частности псевдогенизации [16, 17, 18]. В ряде случаев были получены доказательства увеличения транспозиционной активности уже в первых поколениях полиплоидных растений [19–22]. У гексаплоидной пшеницы, например, потеря экспрессии локуса глютеина *Glu-1* связана с инсерцией ретранспозона длиной 8 kb в кодирующую область данного гена. У аутотетраплоида *Arabidopsis thaliana* с помощью микроэлектронного ДНК выявлена активация *En/Spm* транспозонов [19].

Одним из механизмов скачкообразного изменения генома при дупликации может быть изменение экспрессии генов вследствие ДНК-метилирования. Метилирование цитозина часто встречается в растениях и, как полагают, играет определенную роль в регуляции экспрессии генов, времени репликации ДНК и др. [23, 24].

Следует отметить, что большая часть экспериментальных данных касательно молекулярно-генетических изменений при дупликации генома получена на естественных полиплоидах (в подавляющем большинстве на аллополиплоидах) в поздних поколениях, и многие молекулярно-генетические изменения у аллополиплоидов привносятся не самой дупликацией генома, а гибридизацией, т.е. объединением в одном геноме двух субгеномов. Поэтому синтетические аутотетраплоиды ржи ранних поколений представляют большой интерес в плане исследования молекулярно-генетических изменений генома, вызванных непосредственно самой дупликацией. Цель нашей работы состояла

в изучении структурных изменений генома ржи (*Secale cereale* L.) в ранних поколениях (F_{3-6}) после зиготической дупликации.

Материалы и методы

Получение материала. Материалом для исследований служили зиготические тетраплоидные формы ржи ($2n = 28$), полученные на генетической основе диплоидных сортов и гибридов (Валдай × Каупо, Зарница, Юбилейная, Плиса, Алькора) с использованием метода полиплоидизации (дупликации генома) закисью азота (N_2O) в первом делении зиготы [25] (табл. 1). Выделение тетраплоидов путем подсчета числа хромосом проводили на давленных препаратах апикальных меристем корня, окрашенных 2%-ным раствором ацетокармина в 45%-ной уксусной кислоте.

Измерение количества ДНК. Цитологические препараты для измерения содержания ДНК в клеточных ядрах готовили по методике, используемой для определения плоидности томатов с помощью проточной цитофотометрии клеточных ядер [26, 27]. Результаты анализировали в программе ImageJ.

Выделение ДНК проводилось с помощью Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) согласно рекомендованному протоколу.

SCAR-анализ. Для проведения ПЦР (SCAR) использовался амплификатор C1000 Touch Thermal Cycler BIO-RAD. Реакционный раствор объемом 25 мкл содержал: 11 мкл H_2O , по 2,5 мкл $PCRb$ и $dNTP$, по 1 мкл $MgCl_2$ и $Formamid$, 0,2 мкл Taq -полимеразы, по 1 мкл прямого и обратного праймера, 5 мкл раствора ДНК. Праймеры, используемые для определения структурных изменений отдельных локусов (*Sec-1* и *Sec-2*) и секвенирования (*REMS12128*), указаны в табл. 2.

Таблица 1

Тетраплоидные образцы ($2n = 28$) и поколение после дупликации

Образец	Поколение после дупликации
Валдай × Каупо	F_3
Зарница	F_5
Юбилейная	
Плиса	F_6
Алькора	

Таблица 2

Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализируемых локусов озимой ржи

Локус	Последовательности праймеров	Условия ПЦР
<i>Sec-1</i>	F: 5'-CTATTAGTTCGAAAAGCTTATGA-3' R: 5'-GCATATGACTCAAATATTTTTT-3'	94 °C – 5 мин 94 °C – 1 мин 50 °C – 2 мин 72 °C – 3 мин 72 °C – 10 мин } 35 циклов
<i>Sec-2</i>	F: 5'-ATGAAGACCTTACTCATGCTTGCAA-3' R: 5'-TCAGTGGCCAACAATACCAGTG-3'	94 °C – 5 мин 94 °C – 40 с 54 °C – 50 с 72 °C – 2 мин 72 °C – 10 мин } 35 циклов
REMS1218	F: 5'-CGCACAAACAAAAACACGAC-3' R: 5'-CAAACAAACCCATTGACACG-3'	95 °C – 2 мин 95 °C – 30 с 55 °C – 30 с 72 °C – 1 мин 72 °C – 6 мин } 38 циклов

Секвенирование проводили на секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems). Для терминальной ПЦР использовали BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Смесь для терминальной реакции содержала 0,5 мкл BigDye Terminator v3.1, 1,5 мкл 5х буфера для BigDye Terminator v3.1, 2 мкл H₂O, 1 мкл прямого или обратного праймера, 1 мкл раствора ДНК. Для очистки ампликона использовался 125 мМ ЭДТА, 96 и 70% этанол, 3М ацетат натрия. Очистка проводилась по инструкции к BigDye Terminator v3.1. Результаты анализировались в программе Geneious.

Результаты и обсуждение

Анализ содержания ДНК у тетраплоидных форм

Многими исследователями было обнаружено, что количество ДНК не увеличивается прямо пропорционально увеличению уровня плоидности [7, 28, 29, 30]. Установлено, что часть ДНК элиминирует с увеличением уровня плоидности.

С целью определения количества ДНК у тетраплоидных форм ржи в сравнении с исходными диплоидными сортами произведено цитофотометрическое измерение содержания ДНК их ядер. Относительное содержание ДНК в клетках тетраплоидов и исходных диплоидов ржи определяли при помощи флуорохрома акридиновый оранжевый – бромид аэтидия, флуоресценция которого пропорциональна содержанию ДНК в клеточном ядре.

Ядра анализировались при помощи компьютерной обработки цифровых микрофотографий, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа. Мерой количества ДНК в ядре служит показатель интегральной яркости, который прямо пропорционален содержанию ДНК в ядре и измеряется в Дж·м⁻²·ср⁻¹. Однако, при измерении количества ДНК учитывались также такие показатели как периметр и площадь ядра. Поэтому во избежание путаницы с единицами измерения мерой количества ДНК будут служить условные единицы (усл. ед.).

Анализировались формы тетраплоидной ржи поколений F₃₋₆ после полиплоидизации. У каждого образца было исследовано порядка 60–80 ядер. Контролем служили исходные диплоидные сорта ржи.

На рис. 1 представлена гистограмма соотношения количества ДНК у тетраплоидных форм с исходными диплоидными сортами.

У диплоидных сортов ржи среднее количество ДНК варьировало от 0,56 (Валдай × Каупо) до 0,79 усл.ед. (Юбилейная) и составляло в среднем 0,66 усл. ед. У созданных на их основе тетраплоидных форм среднее количество ДНК варьировало от 1,01 (Зарница) до 1,39 усл. ед. (Юбилейная) и составляло в среднем 1,12 усл. ед.

Как видно из данных гистограммы, отношение количества ядерной ДНК у тетраплоидов к диплоидам варьирует от 1,58 (Алько-

ра) до 1,82 (Валдай × Каупо) и составляет в среднем 1,69, что на 0,31 меньше теоретически ожидаемого 2. Это свидетельствует об элиминации части ДНК у тетраплоидных форм.

Количество элиминированной ДНК у тетраплоидов ржи варьировало от 10,0 до 28,0% и составляло в среднем 20,2% (табл. 2). Наибольшее количество ДНК элиминировало у тетраплоида Алькора (28,0%), наименьшее – у

тетраплоида Валдай × Каупо (10,0%).

Количество элиминированной ДНК, вероятно, зависит также от поколения после полиплоидизации. У тетраплоида Валдай × Каупо в 3-ем поколении после полиплоидизации элиминировано всего 10% ядерной ДНК, в то время как у тетраплоидов Зарница, Юбилейная, Алькора, Плиса в 5-6-ом поколениях после полиплоидизации элиминировано от 19 до 28% ДНК.

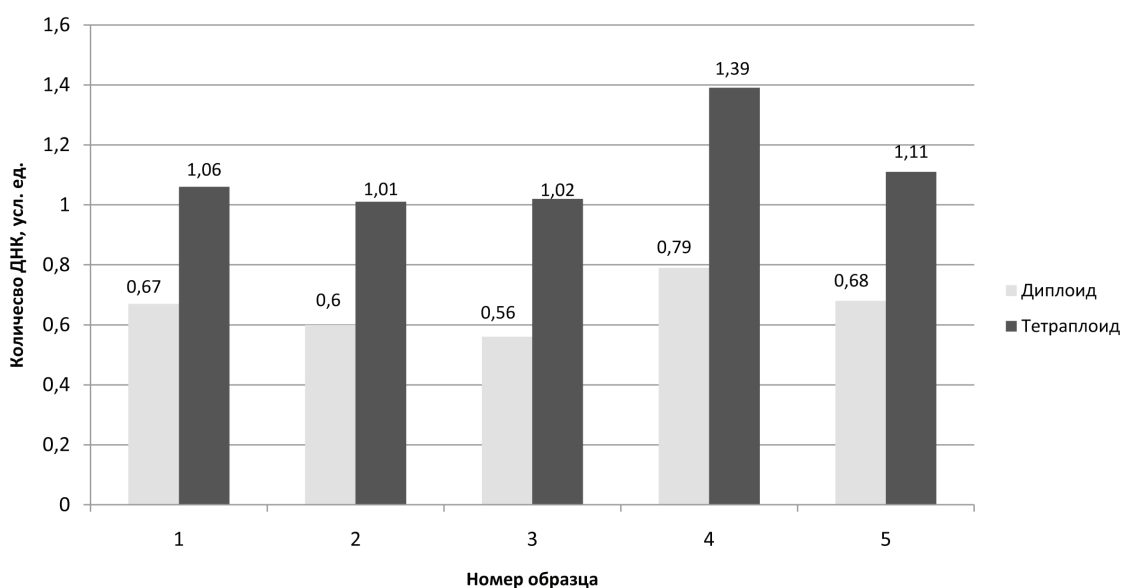


Рис. 1. Гистограмма соотношения количества ДНК у тетраплоидных форм с исходными диплоидными сортами: 1 – Алькора; 2 – Зарница; 3 – Валдай × Каупо; 4 – Юбилейная; 5 – Плиса

Таблица 2

Количество элиминированной ДНК у тетраплоидов ржи

Сорт	Плоидность	Поколение после полиплоидизации	Количество ДНК, усл. ед.	Количество элиминированной ДНК, %
Алькора	Диплоид (2n=14)	–	0,67	28,0
	Тетраплоид (2n=28)	F ₆	1,06	
Зарница	Диплоид (2n=14)	–	0,60	19,0
	Тетраплоид (2n=28)	F ₅	1,01	
Валдай × Каупо	Диплоид (2n=14)	–	0,56	10,0
	Тетраплоид (2n=28)	F ₃	1,02	
Юбилейная	Диплоид (2n=14)	–	0,79	19,0
	Тетраплоид (2n=28)	F ₅	1,39	
Плиса	Диплоид (2n=14)	–	0,68	25,0
	Тетраплоид (2n=28)	F ₆	1,11	
Среднее				20,2

Анализ полиморфизма локусов запасных белков Sec-1 и Sec-2

С целью изучения структурных изменений на уровне ДНК, происходящих при дупликации генома, проведен ПЦР-анализ локусов запасных белков *Sec-1*, *Sec-2*.

Sec-1-локус локализован на коротком плече ржаной хромосомы 1R. Данный локус кодирует синтез двух фракций секалинов: ω -секалинов и 40k γ -секалинов [31]. Набор праймеров подобран согласно известной последовательности нуклеотидов части локуса *Sec-1*, кодирующего ω -секалины.

Количество амплифицированных фрагментов (ампликонов) в сумме у 10 исследуемых образцов составило 21, в том числе у диплоидов – 11, у тетраплоидов – 10 (рис. 2).

Размер ампликонов составлял от 750 до 1500 п.н. У всех десяти образцов устойчиво амплифицировался фрагмент размером 1500 п.н. Полиморфизм по данному локусу из всех 10 образцов обнаружен у Алькоры диплоидной и созданной на ее основе тетраплоидной формы, а также у Юбилейной диплоидной и созданной на ее основе тетраплоидной формы.

У Алькоры диплоидной амплифицировались фрагменты размером 750 и 1000 п.н. отсутствующие у созданной на ее основе тетраплоидной формы. У Юбилейной диплоидной амплифицировался фрагмент размером 750 п.н., отсутствующей у созданной на ее основе Юбилейной тетраплоидной. Также у Юбилейной тетраплоидной амплифицировался фрагмент размером 1000 п.н., отсутствующий у исходной диплоидной формы. В целом у всех диплоидов и созданных на их основе тетраплоидов обнаружено 8 (72,7%) общих и 3 (27,3%) специфических фрагмента.

75k γ -секалины являются наиболее распространенной группой секалинов и составляют примерно 50% всей фракции секалинов. Они контролируются *Sec-2*-локусом, локализованным на 2RS хромосоме. 75k γ -секалины входят в состав соединений с внутри- и межмолекулярными дисульфидными связями, что играет важную роль в использовании ржи в качестве источника питания. Также 75k γ -секалины увеличивают пропорцию глутамата + глутамина и пролина белков ржи более эффективно, чем 40k группа се-

калинов и другие группы. Это качество 75k γ -секалинов может быть использовано в селекции ржи.

Подобран праймер к кластеру генов 75k γ -секалина (см. Материалы и методы). Данный праймер успешно используется для идентификации 2RS хромосомы в геноме тритикале [32].

Количество амплифицированных фрагментов (ампликонов) в сумме у 10 исследуемых образцов составило 36, в том числе по 18 у диплоидов и тетраплоидов соответственно. В целом у диплоидов и тетраплоидов по всем 10 образцам обнаружено 13 (61,9%) общих и 8 (38,1%) специфических фрагментов (рис. 3).

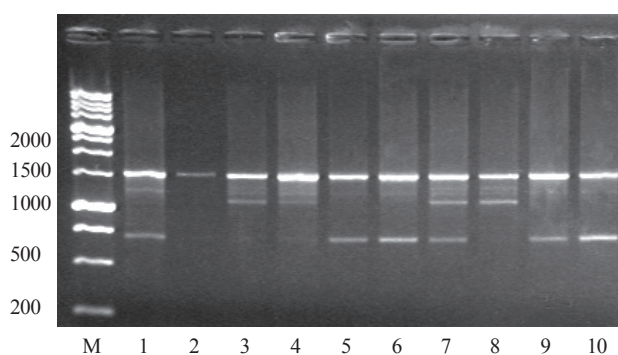


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК локуса *Sec-1*(ω -секалина) у диплоидов (2х) и созданных на их основе тетраплоидов (4х) ржи: 1 – Зарница 4х; 2 – Алькора 4х; 3 – Плиса 4х; 4 – Юбилейная 4х; 5 – Валдай × Каупо 4х; 6 – Зарница 2х; 7 – Алькора 2х; 8 – Плиса 2х; 9 – Юбилейная 2х; 10 – Валдай × Каупо 2х; М – маркер молекулярного веса M1Kb, п.н.

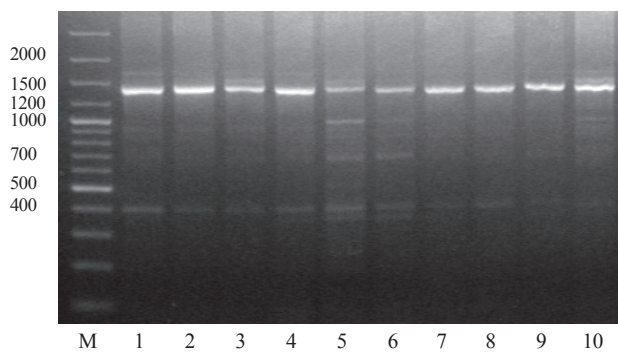


Рис. 3. Электрофореграмма ДНК локуса *Sec-2* (75k γ -секалины) у диплоидов и созданных на их основе тетраплоидов ржи: 1 – Зарница 4х; 2 – Алькора 4х; 3 – Плиса 4х; 4 – Юбилейная 4х; 5 – Валдай × Каупо 4х; 6 – Зарница 2х; 7 – Алькора 2х; 8 – Плиса 2х; 9 – Юбилейная 2х; 10 – Валдай × Каупо 2х; М – маркер молекулярного веса 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas), п.н.

У всех диплоидов и тетраплоидов ржи амплифицировался фрагмент размером примерно 1400 п.н., что свидетельствует о наличии *Sec-2* локуса (75k γ-секалинов) у всех проанализированных образцов. Также у всех ди- и тетраплоидов ржи амплифицировался фрагмент размером 400 п.н.

У диплоидов и созданных на их основе тетраплоидов ржи обнаружена амплификация некоторых специфических фрагментов. Так, у тетраплоида Зарница не выявлено фрагментов ДНК размером примерно 380 и 700 п.н., присутствующего у исходного диплоида. Также у тетраплоида Зарница обнаружено появление фрагмента размером приблизительно 1700 п.н., отсутствующего у исходного диплоида.

Наличие специфических фрагментов обнаружено также у тетраплоидов Плиса, Юбилейная, Валдай × Каупо, отсутствующих у исходных диплоидов. Наибольшее количество специфических фрагментов обнаружено у ди- и тетраплоида Валдай × Каупо (3 фрагмента). Полученные результаты свидетельствуют о структурных изменениях ДНК при дупликации генома.

Секвенирование локуса *REMS1218* ржи

При SNP-анализе полиплоидных геномов результаты в большинстве случаев получаются неоднозначными. Однако известны при-

меры SNP-полиморфизма при дупликации генома. Р. Bundock и др. [33] при секвенировании 307 ампликонов полиплоида сахарного тростника со средней длиной ряда 220 оснований выявил в среднем 1 замену на 58 оснований. Е. Аханов и др. [34] выявил SNP-полиморфизм между тетраплоидной и гексаплоидной пшеницей.

С целью выявления полиморфизма ДНК по отдельным нуклеотидам (SNP-полиморфизм) у тетраплоидов и исходных диплоидов ржи проведено секвенирование локуса *REMS1218*, входящего в состав гена, контролирующего синтез β-амилазы и тесно сцепленного с хозяйственно-полезным геном короткостебельности *H1* (*Ddw1*). Длина данного локуса составляет 317 п.н. Анализировались формы тетраплоидной ржи F₃₋₆ поколений после полиплоидизации (Зарница, Алькора, Юбилейная, Плиса) и их исходные диплоидные аналоги. Средняя длина ряда по всем образцам составляла 287 п.н. Поскольку первые 50 нуклеотидов секвенатор прочитывал с ошибками, анализ прочитанных последовательностей начинался с 51 нуклеотида (рис. 4). Таким образом, средняя длина анализируемой последовательности по всем образцам составляла 287 – 50 = 237 п.н. (рис. 5, 6).

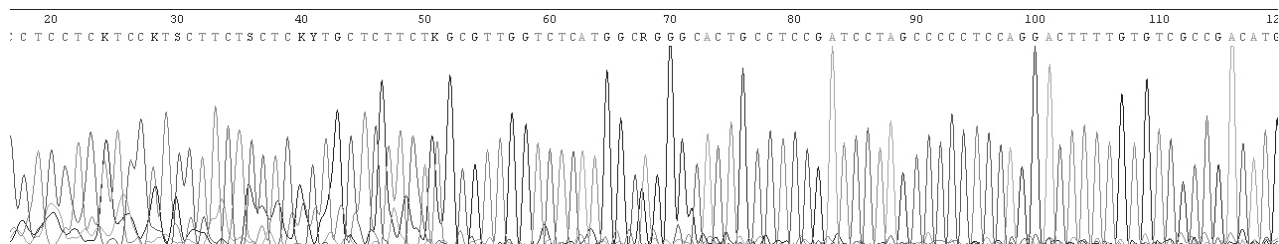


Рис. 4. Прочитанная последовательность локуса *REMS1218* тетраплоида ржи Зарница в программе Chromas

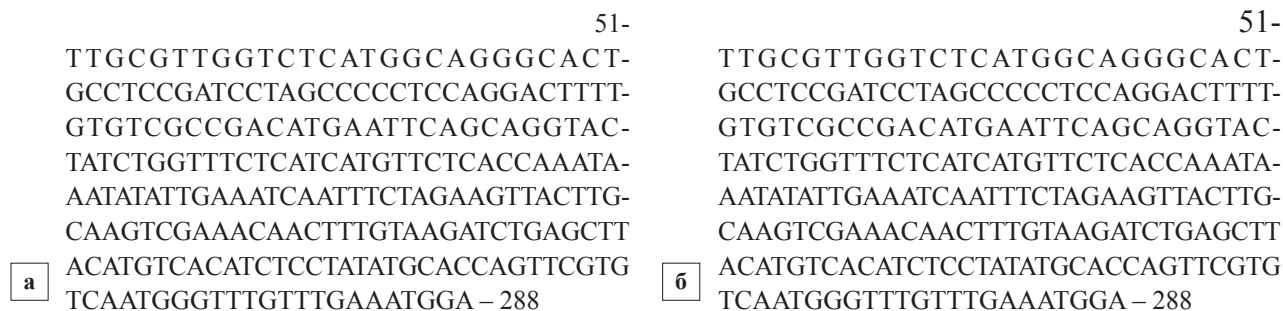


Рис. 5. Последовательность нуклеотидов локуса *REMS1218*: а – у тетраплоида; б – исходного диплоида Зарница (с 51 по 288 п.н.)

51- TTGCGTTGGTCTCATGGCAGGGCACTGCCTCC GATCCTAGCCCCCTCCAGGACTTTTGTGTCGC CGACATGAATTCAGCAGGTAATCTGGTTTCT CATCATGTTCTCACCAAATAAATATAATTGAAAT CAATTTCTAGAAGTTACTTGCAAGTCGAAAC AACTTTGTAAGATCTGAGCTTACATGTCACAT CTCCTCTATGCACCAGTTCGTGTCAATGGGTT а TGTTTGA – 284	51- TTGCGTTGGTCTCATGGCAGGGCACTGCCTCC GATCCTAGCCCCCTCCAGGACTTTTGTGTCGC CGACATGAATTCAGCAGGTAATCTGGTTTCT CATCATGTTCTCACCAAATAAATATAATTGAAAT CAATTTCTAGAAGTTACTTGCAAGTCGAAAC AACTTTGTAAGATCTGAGCTTACATGTCACAT CTCCTCTATGCACCAGTTCGTGTCAATGGGTT б TGTTTGA – 284
--	--

Рис. 6. Последовательность нуклеотидов локуса *REMS1218*: а – у тетраплоида; б – исходного диплоида Алькора (с 51 по 284 п.н.)

Секвенированием локуса *REMS1218* у форм тетраплоидной ржи F_{3-6} поколений после полиплоидизации (Зарница, Алькора, Юбилейная, Плиса) и их исходных диплоидных аналогов не выявлено замен, выпадений или вставок нуклеотидных оснований.

Заключение

Таким образом, в результате дупликации генома ржи происходит элиминация части ядерной ДНК (10,0–28,0%). Рядом исследователей показано, что у эукариот после дупликации генома на фоне «избыточности» ДНК элиминируют некодирующие последовательности [35], целые сегменты хромосом, высокоповторяющиеся последовательности ДНК, теломерный гетерохроматин [36]. Элиминация части ДНК может быть обусловлена различными рекомбинационными механизмами, такими как неравные и «незаконные» гомологичные рекомбинации, активация ретротранспозонов. По мнению ряда авторов [37, 38, 39], основным фактором, способствующим редукции размера генома у полиплоидов, является естественный отбор, благоприятствующий видам с уменьшенным количеством ДНК.

Выявлены структурные изменения ДНК в локусах запасных белков *Sec-1* и *Sec-2* при дупликации генома ржи. Обнаруженные структурные изменения на уровне ДНК происходят при дупликации генома и могут быть обусловлены:

- структурными изменениями хромосом (дупликации, делеции, транслокации или инверсии отдельных участков хромосом) в результате нарушения у тетраплоидов конъюгации хромосом в мейозе;
- потерей одних генов и специфической инактивацией других;

- блочными перестройками, которые приводят к комбинированию фрагментов из разных генов и к появлению белков с разными функциями при дупликации генома.

При секвенировании локуса *REMS1218* замены, выпадения или вставки нуклеотидных оснований не обнаружены. Однако Р. Bundock и др. [33] выявили 1 замену на 58 оснований в среднем у каждого полиплоидного растения при секвенировании 307 ампликонов полиплоида сахарного тростника со средней длиной рида 220 оснований. Эти результаты, возможно, связаны с тем, что исследования проводились на естественных аллополиплоидах. Мы же в своей работе использовали синтетические аутетраплоиды ржи в ранних поколениях (F_{3-6}) после зиготической дупликации.

Список использованных источников

1. Урбан, Э.П. Озимая рожь в Беларуси: Селекция, семеноводство, технология возделывания / Э.П. Урбан // Минск: Беларус. навука, 2009. – 269 с.
2. Piskur, J. Origin of the duplicated regions in the yeast genomes / J. Piskur // Trends Genet. – 2001. – Vol. 17. – P. 302–303.
3. Kellis, M. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / M. Kellis, B.W. Birren, E.S. Lander // Nature – 2004. – Vol. 428. – P. 617–624.
4. Scannell, D.R. Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploidy yeast / D.R. Scannell, K.P. Byrne, J.L. Gordon // Nature. – 2006. – Vol. 440. – P. 341–345.
5. Chen, C.C. Patterns of internal gene duplication in the course of metazoan evolution / C.C. Chen, W.H. Li, H.M. Sung // Gene. – 2007. – Vol. 396. – P. 59–65.

6. The gain and loss of genes during 600 million years of vertebrate evolution / T. Blomme [et al.] // *Genome Biol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 43.
7. Bennett, M.D. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates / M.D. Bennett, P. Bhandol, I.J. Leitch // *Annals of Botany.* – 2000. – Vol. 86. – P. 859–909.
8. Blanc, G. Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution/ G. Blanc, K.H. Wolfe // *Plant Cell.* – 2004. – Vol. 16 (7). – P. 1679–1691.
9. A genome-wide comparison of genes responsive to autopolyploidy in *Isatis indigotica* using *Arabidopsis thaliana* affymetrix genechips/ B.B. Lu [et al.] // *Plant Molecular Biology Reporter.* – 2006. – N 24 – P. 197–204.
10. Wilson, H.D. Loss of duplicate gene expression in tetraploid *Chenopodium* / H.D. Wilson, S.C. Barber, T. Walters // *Biochem Syst Ecol.* – 1983. N 11. – P. 7–13.
11. Hypomethylated sequences: characterization of the duplicate soybean genome / T. Zhu [et al.] // *Mol Gen Genet.* – 1994. – N 244. – P. 638–645.
12. Dubcovsky, J. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the *Triticeae* genomes/ J. Dubcovsky, J. Dvorák // *Genetics.* – 1995. – N 140. – P. 1367–1377.
13. Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum* / R.A. Volkov [et al.] // *Mol Biol Evol.* – 1999. – N 16. – P. 311–320.
14. Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by in situ hybridization / H.M. Thomas [et al.] // *Genome.* – 1997. – N 40. – P. 406–410.
15. Snowdon, R.J. Chromosomal localization and characterization of rDNA loci in the *Brassica* A and C genomes / R.J. Snowdon, W. Köhler, A. Köhler // *Genome.* – 1997. – N 40. – P. 582–587.
16. Grandbastien, M.A. Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics / M.A. Grandbastien, A. Spielmann, M. Caboche // *Nature.* – 1989. – N 337. – P. 376–380.
17. Marillonnet, S. Retrotransposon insertion into the maize waxy gene results in tissue-specific RNA processing / S. Marillonnet, S.R. Wessler // *Plant Cell.* – 1997. – N 9. – P. 967–978.
18. May, B.P. Transposon sequences drive tissue-specific expression of the maize regulatory gene R-s / B.P. May, S.L. Dellaporta // *Plant J.* – 1998. – N 13. – P. 241–247.
19. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids / A. Madlung [et al.] // *Plant J.* – 2005. – Vol. 41. – P. 221–230.
20. Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina* / C. Parisod [et al.] // *New Phytol.* – 2009. – Vol. 184. – P. 1003–1015.
21. Mobilization of retrotransposons in synthetic allotetraploid tobacco / M. Petit [et al.] // *New Phytol.* – 2010. – Vol. 186. – P. 135–147.
22. Sarilar, V. Allopolyploidy has a moderate impact on restructuring at three contrasting transposable element insertion sites in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids / V. Sarilar, P.M. Palacios, A. Rousselet // *New Phytol.* – 2013. – Vol. 198. – P. 593–604.
23. DNA methylation in plants / E.J. Finnegan [et al.] // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* – 1998. – Vol. 49. – P. 223–247.
24. Richards, E. DNA methylation and plant development / E. Richards // *Trends Genet.* – 1997. – Vol. 13. – P. 319–323.
25. Белько, Н.Б. Методические рекомендации по полиплоидизации (дупликации генома) ржи (*Secale cereale* L.) с использованием азота закиси (N_2O) / Н.Б. Белько, И.С. Гордей, И.А. Гордей. – Минск: Право и экономика, 2012. – 28 с.
26. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry / J. Loureiro [et al.] // *Annals of Botany.* – 2006. – Vol. 98, N 3. – P. 679–689.
27. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species / J. Loureiro [et al.] // *Annals of Botany.* – 2007. – Vol. 100, N 4. – P. 875–888.
28. Bennett, M.D. Chromosome evolution in polyploid plants / M.D. Bennett, L. Hanson, I.J. Leitch // *Cytogenetics and Cell Genetics.* – 1998. – Vol. 81. – 124 p.
29. Parisod, C. Evolutionary consequences of autopolyploidy / C. Parisod, R. Holderegger, C. Brochmann // *New Phytologist.* – 2010. – N 186. – P. 5–17.
30. Genome size in natural and synthetic autopolyploids and in natural segmental allopolyploid of several *Triticeae* species / T. Eilam [et al.] // *Genome.* 2009. – N 52. – P. 275–285.

31. Shimizu, Y. Detection of the *Sec-1* locus of rye by a PCR-based method / Y. Shimizu, S. Nasuda, T.R. Endo // *Genes Genet. Syst.* – 1997. – Vol. 72. – P. 197–203.
32. Molecular characterization and comparative analysis of four new genes from *Sec2* locus encoding 75k γ -secalins of rye species / Q.J. Chen [et al.] // *Journal of Cereal Science.* – 2008. – N. 48. – P. 111–116.
33. Bundock, P.C. Targeted single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in a highly polyploidy plant species using 454 sequencing / P.C. Bundock [et al.] // *Plant Biotechnol J.* – 2009. – Vol. 7. – P. 347–354.
34. Akhunov, E. Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina Golden Gate assay / E. Akhunov, C. Nicolet, J. Dvorak // *Theor Appl Genet.* – 2009. – Vol. 119. – P. 507–517.
35. Ozkan, H. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) / H. Ozkan, A.A. Levy, M. Feldman // *Plant Cell.* – 2001. – Vol. 13. – P. 1735–1747.
36. Gustafson, J.P. The effect of telomeric heterochromatin from *Secale* cereal on *Triticale* (x *Triticosecale*). I. The influence of the loss of several blocks of telomeric heterochromatin on early endosperm development and kernel characteristics at maturity / J.P. Gustafson, M.D. Bennett // *Canadian Journal of Genetics and Cytology.* – 1982. – Vol. 24 – P. 83–92.
37. Devos, K.M. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in Arabidopsis / K.M. Devos, J.K.M. Brown, J.L. Bennetzen // *Genome Research.* – 2002. – Vol. 12. – P. 1075–1079.
38. Fedoroff, N. Transposons and genome evolution in plants / N. Fedoroff // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* – 2000. – Vol. 97 – P. 7002–7007.
39. A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion / K.A. Shirasu [et al.] // *Genome Research.* – Vol. 10. – 2000. – P. 908–915.

I.S. Gordej

STRUCTURAL CHANGES OF RYE GENOME AFTER ZYGOTIC DUPLICATION

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

The structural changes of rye genome in early generations (F_{3-6}) after zygotic duplication are studied. It is shown that the rye genome duplication leads to the elimination of the nuclear DNA from the tetraploid, structural changes in DNA loci of spare rye proteins *Sec-1* and *Sec-2*. There were no substitutions, deletions or insertions of nucleotides in β -amylase *REMS1218* with the genome duplication of rye.

Key words: rye, genome duplication, tetraploids, diploids, molecular, genetic, DNA, nuclear, nucleotids

Дата поступления статьи 6 сентября 2016 г.

Е.Н. Сысолятин, Н.В. Анисимова, О.Г. Бабак, А.В. Кильчевский

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА SRAP-RGA-ПЦР ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ УЗКОЛИСТНОГО ЛЮПИНА

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
220072, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: E.Sysoliatin@igc.by, N.Anisimova@igc.by, Kilchev@presidium.bas-net.by

Проведено сравнительное изучение ДНК-полиморфизма образцов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) с помощью методов SRAP-RGA и ISSR. Выявлены преимущества метода SRAP-RGA в сравнении с известными методиками ISSR-анализа. Проведена оценка эффективности применения различных комбинаций праймеров для определения генетического полиморфизма. Выделены наиболее информативные пары праймеров (tm/me8, p-loop/r14, p-loop/em12, p-loop/fl2) с высокими значениями маркерного индекса MI.

Ключевые слова: люпин, маркер, метод SRAP-RGA.

Введение

Люпин узколистный (*Lupinus angustifolius* L.) – ценная для Беларуси зернобобовая культура, богатый источник высококачественного растительного кормового и пищевого белка, сбалансированного по аминокислотному составу ($\approx 40\%$ сухого вещества составляют незаменимые аминокислоты). Узколистный люпин удобен в возделывании, поскольку адаптирован к дефициту азота и фосфора, кислым, песчаным почвам. Способность к симбиотической фиксации азота определяет его сидеральные свойства, делая люпин полезным предшественником при ротации со злаковыми и другими сельскохозяйственными культурами, что способствует повышению эффективности растениеводства.

Однако распространение люпина в нашем регионе во многом лимитировано потерями урожая из-за воздействия патогенов, что является серьезной проблемой. Потери урожая люпина от болезней нередко составляют 25–75%, иногда достигая полной гибели посевов. Успешное возделывание люпина невозможно без разработки и применения определенных мер защиты растений от многочисленных болезней и вредителей. Агротехнические и химические приемы иногда или недостаточно эффективны, или экономически непригодны. Одним из наиболее эффективных и экологи-

чески безопасных способов защиты люпина от болезней и вредителей, обеспечивающим интенсификацию этой области растениеводства, является создание устойчивых к болезням сортов.

Разработка и применение молекулярно-генетических методов для создания сортов позволяют ускорить процесс улучшения люпина. В современной селекции для паспортизации сортов используются различные методики маркирования хозяйственно ценных признаков. Для паспортизации люпина применяются методики с использованием белковых маркеров [1], а также ДНК-маркеров: ISSR и RAPD [2]. Однако эти методы имеют некоторые ограничения. Так, белковые маркеры не подходят для анализа культур, имеющих низкий уровень внутривидового полиморфизма, а RAPD-праймеры (по причине низкой температуры отжига) и ISSR-праймеры к двух-трехнуклеотидным повторам [3] показывают низкий уровень воспроизводимости полученных результатов.

Свою эффективность при разработке молекулярных маркеров устойчивости к биотическим факторам показали методики RGA-ПЦР (resistance gene analogs). R-гены растений содержат в своем составе консервативные последовательности, соответствующие структурным мотивам защитных R-белков. Эти последовательности, в силу

своей постоянной структуры, используются в качестве мишеней для вырожденных праймеров, с помощью которых можно осуществлять поиск возможных генов устойчивости у различных видов растений. RGA-праймеры были использованы для выделения аналогов генов устойчивости у ряда видов растений [4, 5, 6], в том числе желтого [7] и узколистного [8] люпина.

Разрешающая способность методов анализа с помощью вырожденных праймеров повышается в комбинации с методом SRAP (sequence-related amplified polymorphism), который основывается на амплификации открытых рамок считывания [9]. При этом применяются 2 праймера длиной 17 или 18 нуклеотидов, состоящие из нескольких элементов. Один из этих элементов – основная последовательность длиной от 13 до 14 оснований, где первые 10 или 11 оснований, начиная с 5'-конца, представляет собой последовательность неспецифического состава («последовательность-заполнитель»), за которой следует последовательность CCGG в прямом и AATT в обратном праймере. Праймеры с участками CCGG предпочтительно садятся в пределах открытых рамок считывания из-за наличия GC-повторов преимущественно в кодирующих областях. Последовательность AATT обратного праймера чаще встречается в областях промоторов и интронов, которые более подвержены изменениям в ДНК [10]. За основной последовательностью на 3'-конце следуют три селективных нуклеотида, которые обеспечивают специфичность реакции амплификации. Поскольку SRAP-праймеры имеют высокую температуру отжига (50 °C и выше) и не содержат в своем составе многочисленных повторяющихся элементов, этот метод характеризуется большей воспроизводимостью результатов, чем методики ISSR и RAPD. Так как при данном методе предпочтительно амплифицируются открытые рамки считывания, обнаруженный с его помощью ДНК-полиморфизм имеет большую вероятность быть связанным с фенотипическим проявлением признаков.

N. Mutlu et al. [11] показали высокую эффективность выявления полиморфизма с помощью различных комбинаций RGA- и SRAP-

праймеров по сравнению с чистыми методами RGA и SRAP. Учитывая низкую специфичность используемых праймеров, данные методы могут быть применены на различных культурах для поиска полиморфизма и создания маркеров генов, определяющих устойчивость растений к заболеваниям.

Цель нашей работы – установление возможности использования SRAP-RGA-анализа для исследования полиморфизма аналогов генов устойчивости у люпина узколистного, проведение сравнительного исследования эффективности методов SRAP-RGA-анализа и ISSR-анализа для дифференциации генотипов.

Материалы и методы

В нашем исследовании были использованы образцы *L. angustifolius* из коллекции Белорусского государственного университета. Для работы отобраны 12 образцов люпина узколистного различного генетического и эколого-географического происхождения: Yorrel, Wonga, Tanjil, Fest, Illyarrie, (Австралия); Брянский 1121, Немчиновский 846, Брянский 1272 (Россия); Миртан, Першацвет, Ашчадны (Беларусь); Frost (США).

Выделение ДНК из генеративных и вегетативных органов осуществляли с помощью набора «Нуклеосорб» (ОДО «Праймтех») комплектации С. В качестве источника ДНК использовали молодые верхушечные листья растений. Растительную ткань предварительно гомогенизировали путем растирания с жидким азотом или встряхивания с металлическими бусами. Выделение ДНК проводили в трех биологических повторностях.

Концентрацию полученного раствора ДНК определяли методом спектрофотометрии на приборе NanoDrop 2000.

Для изучения образцов люпина узколистного использовали праймеры к трансмембранному (ТМ) домену (5'-ARNGCTARNGGNARNCC-3') и r-loop домену (5'-GGNGGNGTNGGNAANACNAC-3') R-генов устойчивости к заболеваниям [4]. Каждый из этих праймеров был использован в различных комбинациях с 7 SRAP-праймерами при постановке реакций амплификации, что в итоге дало 14 комбинаций SRAP-RGA-праймеров. Список использованных SRAP-праймеров представлен в табл. 1.

Таблица 1

Список SRAP-праймеров, использованных в работе

Название	Последовательность 5'-3'	Ссылка
Me8	TGAGTCCAAACCGGACT	[11]
F12	CGAATCTTAGCCGGAGC	[12]
F16	GATCCAGTTACCGGCAC	[12]
Em12	GACTGCGTACGAATTCTC	[11]
Em5	GACTGCGTACGAATTAAC	[11]
r9	GACACCGTACGAATTGA	[12]
r14	CGCACGTCCGTAATTAAC	[12]

Реакцию амплификации проводили в смеси объемом 20 мкл. Состав смеси был следующим: 1 ед. Taq-полимеразы (Dialat), 1x ПЦР-буфер, 5 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 500 пмоль/мкл SRAP-праймера, 500 пмоль/мкл RGA-праймера, 0,5 мкл тотальной геномной ДНК.

Амплификацию начинали плавлением ДНК при 94 °C в течение 5 мин, затем проводили 5 циклов: 94 °C – 1 мин, 38 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин 15 с; а затем 35 циклов: 94 °C – 45 с, 50 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин 15 с; заключительную элонгацию осуществляли при 72 °C в течение 5 мин [11].

Для сравнения эффективности наряду с перечисленными SRAP-RGA-маркерами были использованы наиболее пригодные для паспортизации различных сортов узколистного люпина ISSR-маркеры UBC810, IS2, IS3 [2].

ISSR-типирование осуществляли в ПЦР-смеси объемом 20 мкл, которая содержала 2 ед. Taq-полимеразы (Dialat), 1x ПЦР-буфер, 5 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 50 пмоль праймера, 100 нг тотальной геномной ДНК.

Амплификацию начинали плавлением ДНК при 94°C в течение 5 мин, затем проводили 40 циклов: 94 °C – 45 с, 52 °C – 45 с, 72 °C – 1 мин 30 с. Финальную элонгацию проводили при 72 °C в течение 7 мин. Завершали реакцию охлаждением смеси до 16 °C.

Продукты амплификации разделяли в 2 %-ном агарозном геле, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты реакции амплификации в виде воспроизводимых ДНК-профилей были

вручную зарегистрированы для всех образцов и занесены в бинарную матрицу, где 0 обозначал отсутствие бэнда, а 1 – наличие. Первоначальная оценка праймеров была осуществлена путем учета общего количества бэндов в профилях, а также количества полиморфных бэндов и их отношения к общему числу бэндов в профиле. Для оценки эффективности различных комбинаций праймеров были использованы такие параметры как мера информационного полиморфизма (polymorphism information content, PIC), эффективное мультиплексное отношение (effective multiplex ratio, EMR), разрешающая способность (resolving power, Rp) и маркерный индекс (marker index, MI). Величину PIC рассчитывали по формуле для доминантных маркеров $PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$, где PIC_i – мера информационного полиморфизма локуса i ; f_i – частота, с которой встречался амплифицированный фрагмент; $(1 - f_i)$ – частота, с которой встречалось отсутствие амплификации фрагмента [13, 14, 15]. Частота f_i представляет собой отношение количества образцов, у которых в локусе i амплифицировался фрагмент, к общему количеству изученных образцов.

Полученная бинарная матрица была использована для построения филогенетического дерева по методу невзвешенного попарного среднего (UPGMA) с помощью программы DARwin v. 6.0.13 [16]. Дендрограмму строили исходя из полученных данных эффективности SRAP-RGA-маркеров. Для определения достоверности построенного дерева был проведен бутстрап-анализ с выборкой из 1000 реплик.

Результаты и обсуждение

Первоначальная оценка результатов амплификации показала, что все 14 комбинаций SRAP-RGA-праймеров давали четко детектируемые продукты амплификации (рис. 1).

Количество фрагментов в полученных профилях варьировало от 4 (в комбинации p-loop/me8) до 15 (в комбинациях tm/f12, p-loop/r14). Всего с помощью использованных комбинаций праймеров был получен 121 продукт амплификации, длина которых находилась в диапазоне 100–1700 п.н. Из общего числа полученных фрагментов 35 (28,9%) были полиморфными у различных образцов люпина, использованных нами в исследовании. В двух комбинациях праймеров (tm/em5 и tm/r14) полиморфных фрагментов обнаружено не было. Процент полиморфных фрагментов в зависимости от комбинации праймеров варьировал в диапазоне от 10% (tm/r9) до 50% (p-loop/em12).

При определении показателя PIC для каждой комбинации вычисляли среднее значение PIC по всем локусам данной пары праймеров. Наименьшее значение PIC показывали комбинации праймеров tm/r9 и p-loop/me8 (0,15). Наибольшую меру информационного полиморфизма показала пара tm/f16 (0,44). Приемлемые для дальнейшей работы значения PIC были характерны для пар праймеров tm/Em12 (0,42), p-loop/f16 (0,38), p-loop/r9 (0,33), p-loop/f12 (0,31), tm/f12 (0,28), p-loop/em5 (0,27), p-loop/em12 (0,27), p-loop/r14 (0,25).

Величина эффективного мультиплексного отношения (EMR) зависит от доли полиморфных фрагментов. Наибольшее значение этого показателя наблюдалось у пар праймеров p-loop/r14 (3,27) и tm/me8 (2,08). Наименьшую эффективность показали пары праймеров tm/f16 (0,11) и tm/r9 (0,10).

Показатель разрешающей способности (Rp) используют для отражения способности прай-

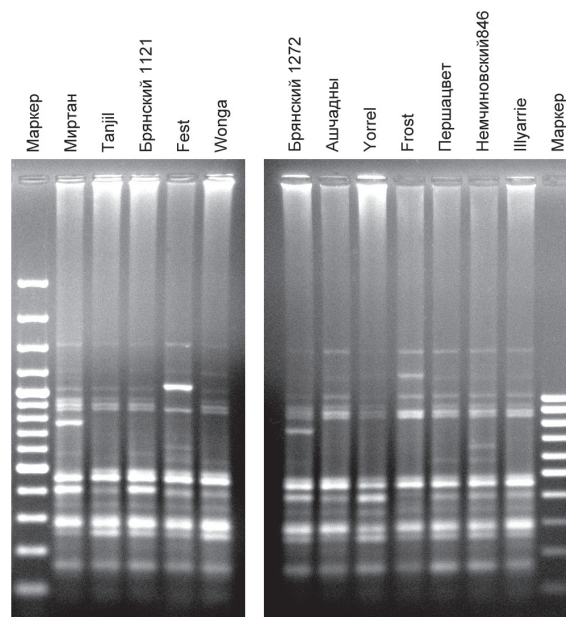


Рис. 1. SRAP-RGA-профили разных сортов люпина, комбинация праймеров p-loop/r14

мера устанавливать различия между генотипами. Среди комбинаций SRAP-RGA наибольшая разрешающая способность была характерна для праймеров p-loop/r14 (2,17), тогда как наименьшая – для tm/r9 и p-loop/me8 (0,17).

Маркерный индекс (MI) представляет собой произведение величины информационного полиморфизма (PIC) и эффективного мультиплексного отношения (EMR) [13] и используется для определения общей полезности различных праймеров при генотипировании. Наилучшие результаты по этому показателю показали праймеры p-loop/r14 (0,81). Низкие значения маркерного индекса были характерны для праймеров tm/f16 (0,05), tm/r9 (0,02) и p-loop/me8 (0,04). Вычисленные показатели по всем комбинациям SRAP-RGA и по ISSR-маркерам представлены в табл. 2.

Таблица 2

Основные показатели эффективности маркеров, вычисленные для каждой комбинации праймеров

Комбинация праймеров	n	n _p	% n _p	PIC	Rp	EMR	MI
tm/me8	12	5	41,67	0,24	1,50	2,08	0,49
tm/f12	15	3	20,00	0,28	1,00	0,60	0,17
tm/f16	9	1	11,11	0,44	0,67	0,11	0,05
tm/Em12	14	3	21,43	0,42	2,00	0,64	0,27

Продолжение табл. 2

Комбинация праймеров	n	n _p	% n _p	PIC	R _p	EMR	MI
tm/r9	10	1	10,00	0,15	0,17	0,10	0,02
p-loop/me8	4	1	25,00	0,15	0,17	0,25	0,04
p-loop/fl2	7	3	42,86	0,31	1,17	1,29	0,40
p-loop/fl6	7	2	28,57	0,38	1,00	0,57	0,21
p-loop/em5	13	4	30,77	0,27	1,50	1,23	0,33
p-loop/em12	6	3	50,00	0,27	1,00	1,50	0,40
p-loop/r9	9	2	22,22	0,33	1,17	0,44	0,15
p-loop/r14	15	7	46,67	0,25	2,17	3,27	0,81
UBC810	13	9	69,23	0,29	3,33	6,23	1,79
IS2	14	3	21,43	0,15	0,5	0,64	0,10
IS3	17	5	29,41	0,26	1,67	1,47	0,38

Примечание. n – общее количество бэндов, n_p – количество полиморфных бэндов, % n_p – процент полиморфных бэндов, PIC – мера информационного полиморфизма, R_p – разрешающая способность, EMR – эффективное мультиплексное отношение, MI – маркерный индекс.

У праймеров tm/fl6 при близком к максимально возможному для доминантных маркеров (0,5) [13] значении PIC (0,44), были низкие показатели разрешающей способности (0,67), эффективного мультиплексного отношения (0,11) и один из самых низких маркерных индексов (0,05). Такая высокая мера информационного полиморфизма объясняется тем, что распределение частот встречаемости единственного фрагмента этого маркера близка к 70% (обнаружен у 8 образцов из 12). Поскольку в случае доминантных маркеров паттерном считается и наличие и отсутствие фрагмента, соотношение аллелей будет близким к 30:70 (P1 = 0,3; P2 = 0,7), а это соответствует высокому PIC [13].

Исходя из полученных показателей, наибольшую эффективность выявления полиморфизма в подобранной нами коллекции образцов показали SRAP-RGA-праймеры p-loop/r14 с одним из самых высоких показателей разрешающей способности и маркерного индекса (MI), несмотря на то, что показатель PIC у этой пары праймеров был относительно невысоким (0,25). Также сравнительно высокий маркерный индекс показывали комбинации праймеров tm/me8, p-loop/fl2, p-loop/em12.

ISSR-праймеры на подобранной нами коллекции образцов имели низкие или умеренные значения PIC в диапазоне от 0,15 (у IS2) до 0,29 (у UBC810). Праймер UBC810 показал высо-

кое значение EMR (6,23) и маркерного индекса (1,79), что обусловлено большим количеством локусов ISSR-маркеров. Показатели остальных ISSR-праймеров были примерно на уровне или ниже значений SRAP-RGA-маркеров.

Дендрограмма, построенная по методу UPGMA на основании бинарной матрицы результатов SRAP-RGA-анализа, представлена на рис. 2.

В результате анализа с помощью SRAP-RGA-праймеров для каждого из изученных образцов люпина удалось получить уникальный набор полиморфных фрагментов. Для полной дифференциации всех образцов было достаточно трех комбинаций SRAP-RGA (p-loop/r14, tm/me8, p-loop/fl2). В то же время результаты анализа образцов узколистного люпина с помощью 3-х отобранных ISSR-праймеров не позволили дифференцировать образцы Illyarrie и Fest. На построенной на основании SRAP-RGA-анализа дендрограмме в обособленные кластеры при уровне бутстрап поддержки >50 выделились группы сортов Немчиновский 846, Першацвет, Fest; Брянский 1272, Миртан, Frost; Ашчадны, Брянский 1121, что свидетельствует об их генетическом сходстве. В структуре дендрограммы кластеры выделились не по географическому признаку. Причиной этому может быть активный обмен селекционным материалом при создании сортов.

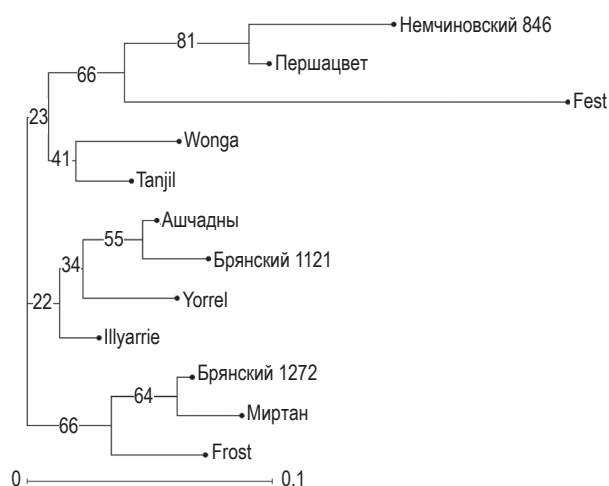


Рис. 2. Дендрограмма образцов узколистного люпина построенная по методу UPGMA на основании данных SRAP-RGA-анализа с помощью комбинаций праймеров с наибольшим маркерным индексом *tm/me8*, *p-loop/r14*, *p-loop/em12*, *p-loop/f12*

Заключение

В работе проведено исследование полиморфизма аналогов генов устойчивости у образцов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.). Дана оценка эффективности применения 14 различных комбинаций RGA-и SRAP-праймеров для генотипирования узколистного люпина. В 12 из 14 комбинаций SRAP-RGA-праймеров были обнаружены полиморфные фрагменты. Значение PIC варьировало в диапазоне от 0,15 до 0,44. По результатам вычисления маркерного индекса наибольшую пригодность для типирования подобранных образцов узколистного люпина показали пары праймеров *p-loop/r14* (MI = 0,81) и *tm/me8* (MI = 0,49), которые планируется использовать в дальнейшей работе по разработке маркеров к интересующим генам.

Показано преимущество метода SRAP-RGA для выявления ДНК-полиморфизма узколистного люпина, связанное с более высоким значением показателя меры информационного полиморфизма (PIC), чем у ISSR-маркеров. С применением SRAP-RGA-анализа для каждого образца удалось получить уникальный набор полиморфных фрагментов, что позволило полностью их дифференцировать. Анализ, проведенный с помощью ISSR-праймеров, не показал различий между образцами *Illyarrie* и *Fest*. Таким

образом, методом SRAP-RGA удалось выявить полиморфизм, который не выявлялся методом ISSR-ПЦР.

На построенной дендрограмме в кластеры выделились 3 группы сортов: Немчиновский 846, Першацвет, *Fest*; Брянский 1272, Миртан, *Frost*; Ашчадны, Брянский 1121, что свидетельствует об их генетическом сходстве.

Уровень полиморфизма, который показали SRAP-RGA-праймеры, позволяет проводить работу по генотипированию сортов узколистного люпина. В ходе дальнейших исследований для поиска молекулярных маркеров R-генов планируется сопоставить выявленный полиморфизм с фенотипическим проявлением устойчивости узколистного люпина к грибным болезням.

Список использованных источников

1. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян: методические указания / под ред. В.Г. Конарева. – СПб, 2000. – 186 с.
2. Артюхова, А.В. Паспортизация сортов люпина методами ISSR-PCR и RAPD-PCR для биотехнологических исследований: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06, 03.02.07 / А.В. Артюхова; Брянский гос. ун-т им. акад. И.Г. Петровского. – Уфа, 2011. – 22 с.
3. Prince, L. ISSR Genotyping of Endangered Plants Using an Optimized Workflow/ L. Prince // Application Note ISSR Plant Genotyping. [Electronic resource]. – Mode of access: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_077418.pdf?CID=fl-WE18818. – Date of access: 15.08.2015.
4. Kanazin, V. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. / V. Kanazin, L.F. Marek, R.C. Shoemaker // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1996. – N 93. – P. 746–750.
5. Barely disease resistance gene analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. / L.H. Madsen [et al.] // Molecular Genetics and Genomics. – 2003. – N 269. – P. 150–161.
6. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. / D. Leister [et al.] // Nature Genetics. – 1996. – N 14. – P. 421–429.
7. Li, D. The *Ncm-1* gene for resistance to Cucumber mosaic virus in yellow lupin

(*Lupinus luteus*): molecular studies and marker development. PhD thesis / D. Li; Murdoch University. – 2012. – 201 p.

8. A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding / M. You [et al.] // Cell Mol Biol Lett. – 2005. – Vol. 10. N 1. – P. 123–134 / Erratum in: Cell Mol Biol Lett. – 2005. – Vol. 10. – N 2. – P. 363.

9. Li, G. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* / G. Li, C.F. Quiros // Theor Appl Genet. – 2001. – N 103. – P. 455–461.

10. Snowdon, R. Oilseed rape / R. Snowdon, W. Lühs, W. Friedt // Genome mapping and molecular breeding in plants. – Vol. 2: Oilseeds / C. Kole, (ed.). – Springer, Berlin Heidelberg, 2007. – P. 55–114.

11. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant / N. Mutlu [et al.] // Theor Appl Genet. – 2008. – Vol. 117. – N 8. – P. 1303–1312.

12. Genetic diversity of wild *Medicago sativa* by sequence-related amplified polymorphism markers in Xingjiang region, China / J.-X. Ma [et al.] // Pak. J. Bot. – 2013. – N 45. – P. 2043–2050.

13. Чесноков, Ю.В. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия / Ю.В. Чесноков, А.М. Артемьева // Сельхозбиология. – 2015. – № 5. – С. 571–578.

14. AFLP Markers Reveal High Polymorphic Rates in Ryegrasses (*Lolium* Spp.) / R. Roldán [et al.] // Molecular Breeding. – 2000. – Vol. 6. N 2. – P. 125–134.

15. Seyit, A.K. Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey / A.K. Seyit, E.H. Erdogan, P. Emine // African Journal of Agricultural Research. – 2010. – Vol. 5. N 21. – P. 2925–2933.

16. Perrier, X. DARwin software / X. Perrier, J.P. Jacquemoud-Collet / [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: <http://darwin.cirad.fr/> – Date of access: 15.08.2015.

E.N. Sysoliatin, N.V. Anisimova, O.G. Babak, A.V. Kilchevsky

ESTIMATION OF SRAP-RGA PCR METHOD EFFECTIVENESS FOR GENOTYPING NARROW-LEAVED LUPIN

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

Comparative study of blue lupine (*Lupinus angustifolius* L.) samples was conducted with SRAP-RGA and ISSR methods. The advantages of SRAP-RGA method in comparison with known techniques were shown. Various combinations of primers were tested for effectiveness of genetic polymorphism detection. The most informative primer pairs (TM/ME8, p-loop/r14, p-loop/em12, p-loop/f12) with high marker index MI were selected.

Key words: lupin, marker, SRAP-RGA method.

Дата поступления статьи 30 сентября 2016 г.

О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS PUMILUS* С ПОМОЩЬЮ ВИДОСПЕЦИФИЧНОЙ ПЦР

ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 2

Разработан метод идентификации бактерий *Bacillus pumilus* на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющий быстро детектировать данные микроорганизмы, в том числе в почвенных образцах. Сконструированы две пары видоспецифичных праймеров, дающие ампликоны размером 1149 и 553 п.н., соответственно. Специфичность праймеров протестировали на 7 коллекционных штаммах и 27 изолятах, выделенных из пораженных растений. Продукт ПЦР был получен только при использовании ДНК бактерий *B. pumilus* в качестве матрицы. Результаты показали, что ПЦР с разработанными праймерами обеспечивает быстрый, простой и надежный метод обнаружения и идентификации *B. pumilus*.

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, ПЦР, праймеры.

Введение

Грамположительные, аэробные, образующие эндоспоры бактерии *Bacillus pumilus* широко распространены в окружающей среде, и на основании филогенетического анализа строения гена 16S рРНК принадлежат к группе *Bacillus subtilis* [1]. Как и большинство представителей этой группы, *B. pumilus* имеют важное промышленное значение, т.к. являются продуцентами ферментов [2–4], биосурфактантов [5], метаболитов с антибактериальной активностью [6, 7]. Большой интерес представляют штаммы *B. pumilus*, которые потенциально могут использоваться как стимуляторы роста растений [8, 9], деструкторы широкого спектра углеводов в процессах очистки промышленных сточных вод [2], для создания пробиотических препаратов [10]. Однако выяснилось, что данные микроорганизмы могут обладать и патогенными свойствами. В клинической практике зафиксировано несколько случаев развития инфекционных заболеваний, вызванных бактериями *B. pumilus*, у пациентов с ослабленной иммунной системой [11–13]. Есть сведения, что некоторые штаммы *B. pumilus* способны вызывать заболевания у растений: выявлены случаи заражения растений манго в Египте [14], листьев, побегов груши [15] и корневищ имбиря в Китае [16], листьев фасоли в Испании [17], плодов фруктовых деревьев в Турции [18], клубней картофеля в Мали [19]. Фитопатогенные штаммы *B. pumilus* обнаруживают и на территории Беларуси. Так, за последние годы были выделены и идентифицированы более 30 культур *B. pumilus* из пораженных клубней картофеля [20], растений сосны обыкновенной [21], растений огурца и томата. В связи с этим становится актуальной необходимость разработки точных, надежных и быстрых методов обнаружения бактерий *B. pumilus*.

В большинстве случаев идентификация бактерий *B. pumilus* осуществляется на основании физиолого-биохимических тестов в совокупности с секвенированием последовательности рибосомных генов [14, 16, 17] или анализом профиля метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) [14, 18]. Методики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) являются альтернативой классическим микробиологическим методам, а ПЦР с видоспецифичными праймерами по специфичности, чувствительности, скорости проведения анализа превосходит МЭЖК и, когда дело касается близкородственных видов с небольшой степенью вариабельности строения гена 16S рРНК, становится предпочтительнее секвенирования [22]. Доступность баз данных, хранящих информацию о структуре генов различных организмов, дает возможность при разработке видоспецифичных праймеров наиболее полно учитывать и использовать вариабельность анализируемых последовательностей

нуклеотидов, что позволяет обеспечить высокую специфичность диагностических систем, создаваемых на их основе [23].

Целью настоящей работы являлось создание видоспецифичных праймеров для выявления и идентификации бактерий *B. pumilus* методом ПЦР.

Материалы и методы

В работе использовали изоляты бактерий *B. pumilus*, выделенные из пораженных растений на территории Беларуси и коллекционные штаммы *B. pumilus* из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (табл. 1).

Таблица 1

Штаммы бактерий *B. pumilus*, использованные в работе

Штамм	Источник выделения	Место выделения
19.6	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Эмоушен»	КСУП «Светлогорская овощная фабрика», Светлогорский район, Гомельская область
36.2	Растения огурца (<i>Cucumis sativus</i>) сорт «Кураж»	УП ПТКУП «Минский парниково-тепличный комбинат», Минский район, Минская область
39.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Раиса»	УКАП Фирма «Днепр», Могилевский район, Могилевская область
39.3		
32.8	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Бомакс»	
44.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Раиса»	
37.7	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Раиса»	ЧУП «Озерицкий – Агро», Смолевичский район, Минская область
38.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Зук»	
51.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Раиса»	
40.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Старбак»	
41.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Раиса»	КУП «Минская овощная фабрика», Минский район, Минская область
61.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Жеронимо»	
61.3		
T1		
T2		
33.4	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>) сорт «Барселона»	РУП «Витебскэнерго филиал «Весна – энерго», Полоцкий район, Витебская область
33.5		
11-1-1*	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>) сорт «Зарница»	Бобруйский район, Могилевская область
33-3*	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>) сорт «Журавинка»	РУП «Институт защиты растений», Минский район, Минская область
21-3*	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>) сорт «Янка»	
17-2*	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>) сорт «Выток»	РСДУП «Экспериментальная база Зазерье», Пуховичский район, Минская область
6-5-2*	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>) сорт «Здабытак»	

Продолжение табл. 1

Штамм	Источник выделения	Место выделения
63-1-3*	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>) сорт «Бриз»	РУСП «Экспериментальная база Натальевск», Червеньский район, Минская область
63-2-2*		
65-4*	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>) сорт «Атлант»	РУСП «Экспериментальная база Дашковка», Могилевский район, Могилевская область
43-3-1*	Неизвестно	Личное подсобное хозяйство д. Туры, Столинский район, Брестская область
71-4-1*	Неизвестно	Неизвестно
БИМ В-106	Не указано	Получен из ИБФМ, г. Пущино, Россия
БИМ В-171	Дерново-подзолистая почва	Полесский государственный радиационно- экологический заповедник, д. Кулажин, Гомельская область
БИМ В-211	Почва березового леса	Полесский государственный радиационно- экологический заповедник, д. Лесок, Гомельская область
БИМ В-369	Дерново-подзолистая почва	Полесский государственный радиационно- экологический заповедник, Гомельская область
БИМ В-373	Дерново-подзолистая почва	Прилукский заказник, Минский район, Минская область
БИМ В-401	Садово-огородная почва	
БИМ В-394	Дерново-подзолистая почва	д. Соколище, Россонский район, Витебская область

* – штаммы предоставлены сотрудниками кафедры микробиологии Белорусского государственного университета.

Бактериальные культуры выращивали на поверхности агаризованной полноценной среды LB при температуре 30 °С. Геномную ДНК бактерий выделяли с помощью набора реагентов Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience GmbH) согласно инструкции производителя или методом с использованием ЦТАБ [24]. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на приборе MiSeq (Illumina) с использованием комплекта реактивов MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina). Полногеномные последовательности бактерий *B. pumilus* заимствовали из представленных в свободном доступе нуклеотидных последовательностей базы данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США. Множественное выравнивание полногеномных последовательностей осуществляли с помощью программы Mauve 20150226 (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>) [25], для выравнивания отдельных кодирующих последовательностей при подборе праймеров использовали программу ClustalX 2.1 (<http://www.clustal.org/clustal2/>) [26]. Подбор праймеров проводили вручную,

термодинамические параметры олигонуклеотидов и возможность образования вторичных структур анализировали с помощью программы ОлигоКальк (<http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>) [27].

Для постановки ПЦР использовали реактивы и праймеры производства ОДО «Прайм-тех». ПЦР проводили в 15 мкл реакционной смеси, содержащей АМ-буфер с $MgCl_2$, 0,2 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0,4 мкМ праймеров, 1 ед. Taq-полимеразы, ДНК-матрицу. В отрицательный контроль ДНК-матрицы не добавляли. Для проверки праймеров на специфичность использовали препараты тотальной ДНК бактерий *Escherichia coli* XL1-Blue, *Bacillus thuringiensis* 787, *Bacillus amyloliquefaciens* I22, *Bacillus subtilis* 72, *B. thuringiensis* 5081, *Shewanella baltica*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas lundensis*, *Pectobacterium* sp. из рабочей коллекции лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси. В качестве положительного контроля ПЦР при проверке матриц ДНК использовали универ-

сальные праймеры к гену 16S рРНК прокариот – 8F (5' agagtttgatcctggctcag-3') и 1492R (5'-gggtaccttggtacgactt-3') [28].

Оптимальную температуру отжига сконструированных видоспецифичных праймеров определяли экспериментально постановкой ПЦР с градиентом температур 45–55 °С. Оптимизированный протокол амплификации для праймеров bp1K-F и bp1KR включает следующие стадии: начальная денатурация – 3 мин при 95 °С; 35 циклов (денатурация – 30 с при 95 °С, отжиг праймеров – 30 с при 52 °С, элонгация – 1 мин 10 с при 72 °С) и заключительная элонгация – 5 мин при 72 °С. Амплификацию с праймерами bp05K-F и bp05K-R проводили по аналогичному протоколу, за исключением температуры отжига (49 °С) и длительности элонгации внутри цикла (40 с). ПЦР проводили в амплификаторе T100 ThermoCycler (Bio-Rad). Разделение продуктов амплификации проводили путем горизонтального электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл) с использованием ТАЕ-буфера. Для документирования результатов электрофореза применяли систему цифровой визуализации изображения ChemiDoc MP (BioRad). Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве маркера молекулярного веса ДНК использовали GeneRuler™ DNA Ladder Mix (ThermoScientificBio).

Результаты и обсуждение

При постановке специфичной ПЦР необходимо иметь положительный контроль – ДНК целевого организма. В нашем распоряжении имелись коллекционные штаммы *B. pumilus*, однако они не подвергались молекулярно-генетической реидентификации и не могли служить гарантированным положительным контролем. Секвенирование последовательностей рибосомных генов 16S рРНК, 23S рРНК и участков внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) широко применяется для идентификации бактерий [29]. Поэтому на начальном этапе работы нами были определены нуклеотидные последовательности генов рРНК и ряда других диагностически важных локусов изолятов 11-1-1 и 63-2-2, отнесенных по физиолого-биохимическим свойствам к виду *B. pumilus*. Полученные последовательности сравнили с записями из базы данных

GenBank с помощью программы BLAST [23] и установили, что они идентичны на 99–100% с представленными в GenBank нуклеотидными последовательностями бактерий *B. pumilus*. Также было выявлено, что некоторые штаммы родственных видов рода *Bacillus* и даже других родов имеют очень схожее строение гена 16S рРНК: последовательности *Bacillus stratosphericus* B89 и JN179 (код доступа GenBank LN890265.1 и KF687090.1) имеют 100%-ную идентичность с последовательностями изолятов 11-1-1 и 63-2-2; *Geobacillus stearothermophilus* PPL-SSC5 (KM226938.1), *B. xiamenensis* MCCC 1A00008 (JX680066.1), *B. altitudinis* Asd M5-2B (FM955870.1), *B. aerophilus* 20E (KC329821.1) – 99%. Результаты секвенирования в совокупности с физиолого-биохимической характеристикой изолятов 11-1-1 и 63-2-2 позволили подтвердить их принадлежность к виду *B. pumilus*, и в дальнейшей работе обе ДНК-матрицы использовали в качестве положительного контроля при постановке ПЦР. Однако данный способ идентификации (секвенирование последовательностей) довольно трудоемкий, и при определении некоторых близкородственных представителей рода *Bacillus* на видовом уровне только по строению гена 16S рРНК могут возникать трудности из-за высокого сходства последовательностей.

Следующим этапом работы стал подбор видоспецифичных олигонуклеотидов для разработки экспресс-метода ПЦР-детекции бактерий *B. pumilus*. На данный момент опубликована информация об одной паре праймеров, специфичных к гену целлюлазы бактерий *B. pumilus*; получаемый ампликон имеет размер ≈1500 п.н. [30]. При разработке собственных оригинальных праймеров мы руководствовались следующими критериями: размер ампликона не должен значительно превышать 1000 п.н., т.к. небольшой размер получаемого продукта позволяет сократить время амплификации, в то же время, получаемый размер ПЦР-продукта должен быть не менее 150 п.н. для удобства при электрофоретическом методе детекции. Также учитывали возможность использования разрабатываемых праймеров в мультиплексной ПЦР со специфичными праймерами к другим возбудителям бактериозов растений [31] или с универсальными праймерами к прокариотам [28].

Одним из наиболее важных этапов при разработке высокоспецифичных праймеров является выбор участков хромосомной ДНК, практически одинаковых у всех бактерий одного вида и обладающих низким уровнем сходства с близкородственными видами. Для поиска таких локусов у *B. pumilus* использовали геномные последовательности 8 штаммов данного вида, находящиеся в открытом доступе в базе данных GenBank (табл. 2). Выравнивание геномов проводили в программе Mauve 20150226 [25], которая сопоставляет схожие области в анализируемых геномах и визуализирует их как одинаково окрашенные локальные блоки. Программа также отображает степень вариабельности нуклеотидной последовательности на гомологичном участке цепи ДНК. На основании компьютерного анализа были выбраны несколько рамок

считывания, нуклеотидные последовательности которых относительно консервативны у сравниваемых штаммов *B. pumilus*.

По результатам сравнения выбранных нуклеотидных последовательностей с записями из базы данных GenBank в качестве мишеней для подбора специфических праймеров решено было использовать две кодирующие последовательности: ID12_10475 длиной 1475 п.н., кодирующая белок CrtI – фитоин-дегидрогеназу, и ID12_08725 длиной 1758 п.н., кодирующая белок, содержащий WD-домен (номера кодирующих последовательностей указаны для генома *B. pumilus* GR-8). Эти участки хромосомной ДНК присутствуют во всех депонированных в GenBank геномах бактерий *B. pumilus* и имеют низкие значения сходства с последовательностями других видов (табл. 3, 4).

Таблица 2

Геномы, использованные для выравнивания в программе Mauve

Штамм	Длина генома, п.н.	Код доступа в GenBank
<i>Bacillus pumilus</i> MTCC B6033	3 763 493	CP007436.1
<i>Bacillus pumilus</i> GR-8	3 674 849	CP009108.1
<i>Bacillus pumilus</i> W3	3 745 123	CP011150.1
<i>Bacillus pumilus</i> TUAT1	3 723 433	AP014928.1
<i>Bacillus pumilus</i> NJ-V2	3 787 818	CP012482.1
<i>Bacillus pumilus</i> NJ-M2	3 793 419	CP012329.1
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	3 704 641	CP000813.4
<i>Bacillus pumilus</i> SH-B11	3 860 091	CP010997.1

Таблица 3

Результаты сравнения кодирующей последовательности ID12_10475 с нуклеотидными последовательностями базы данных GenBank

Штамм	Покрывтие, %	Ошибка	Степень идентичности, %	Код доступа
<i>Bacillus pumilus</i> GR-8	100	0	100	CP009108.1
<i>Bacillus pumilus</i> C4	100	0	99	CP011109.1
<i>Bacillus pumilus</i> ku-bf1	100	0	99	CP014165.1
<i>Bacillus pumilus</i> TUAT1	100	0	99	AP014928.1
<i>Bacillus pumilus</i> SH-B11	100	0	99	CP010997.1
<i>Bacillus pumilus</i> MTCC B6033	100	0	99	CP007436.1
<i>Bacillus pumilus</i> NJ-V	100	0	99	CP012330.1
<i>Bacillus pumilus</i> NJ-V2	100	0	99	CP012482.1
<i>Bacillus pumilus</i> NJ-M2	100	0	99	CP012329.1

Продолжение табл. 3

Штамм	Покрытие, %	Ошибка	Степень идентичности, %	Код доступа
<i>Bacillus pumilus</i> W3	100	0	99	CP011150.1
<i>Bacillus pumilus</i> PDSLzg-1	100	0	88	CP016784.1
<i>Bacillus</i> sp. WP8	100	0	88	CP010075.1
<i>Bacillus pumilus</i> SH-B9	100	0	86	CP011007.1
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	100	0	86	CP000813.4
<i>Fictibacillus phosphorivorans</i> G25-29	56	1e-28	67	CP015378.1
<i>Bacillus megaterium</i> Q3	74	1e-27	67	CP010586.1
<i>Bacillus</i> sp. INB B 7164	51	7e-25	67	CP015226.1

Таблица 4

Результаты сравнения кодирующей последовательности ID12_08725 с нуклеотидными последовательностями базы данных GenBank

Штамм	Покрытие, %	Ошибка	Степень идентичности, %	Код доступа
<i>Bacillus pumilus</i> GR-8	100	0	100	CP009108.1
<i>Bacillus pumilus</i> W3	100	0	99	CP011150.1
<i>Bacillus pumilus</i> TUAT1	100	0	99	AP014928.1
<i>Bacillus pumilus</i> ku-bf1	100	0	99	CP014165.1
<i>Bacillus pumilus</i> SH-B11	100	0	99	CP010997.1
<i>Bacillus pumilus</i> MTCC B6033	100	0	99	CP007436.1
<i>Bacillus pumilus</i> C4	100	0	99	CP011109.1
<i>Bacillus pumilus</i> NJ-V	100	0	99	CP012330.1
<i>Bacillus pumilus</i> NJ-V2	100	0	99	CP012482.1
<i>Bacillus pumilus</i> NJ-M2	100	0	99	CP012329.1
<i>Bacillus pumilus</i> PDSLzg-1	100	0	88	CP016784.1
<i>Bacillus</i> sp. WP8	100	0	88	CP010075.1
<i>Bacillus pumilus</i> SH-B9	100	0	87	CP011007.1
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	100	0	87	CP000813.4
<i>Megamonas hypermegale</i> ART12/1	2	0,67	84	FP929048.1
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> NBR_scaffold0001863	1	2,3	100	LM435297.1
<i>Hymenolepis diminuta</i> HDID_scaffold0000213	2	2,3	87	LM383746.1

Из табл. 3 и 4 видно, что уровень внутри-видового сходства последовательностей локусов ID12_10475 и ID12_08725 составляет 86–99% и 84–99%, соответственно, а область покрытия – 100%, что, с учетом длины анализируемых фрагментов, предполагает наличие достаточно продолжительных консервативных участков, подходящих для кон-

струирования прямого и обратного праймеров, фланкирующих участок ДНК длиной не менее 500 нуклеотидов. Для поиска районов, пригодных для конструирования видоспецифичных праймеров, последовательности аналогичных локусов 14 штаммов *B. pumilus* выравнивали с использованием программы ClustalX 2.1.

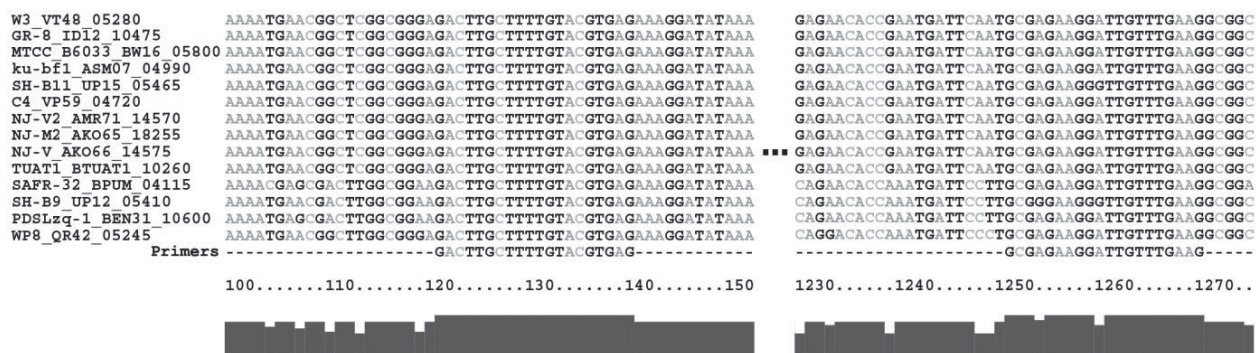


Рис. 1. Расположение пары праймеров bp1K-F и bp1K-R на участках локуса ID12_10475 и гомологичных последовательностях штаммов *B. pumilus*

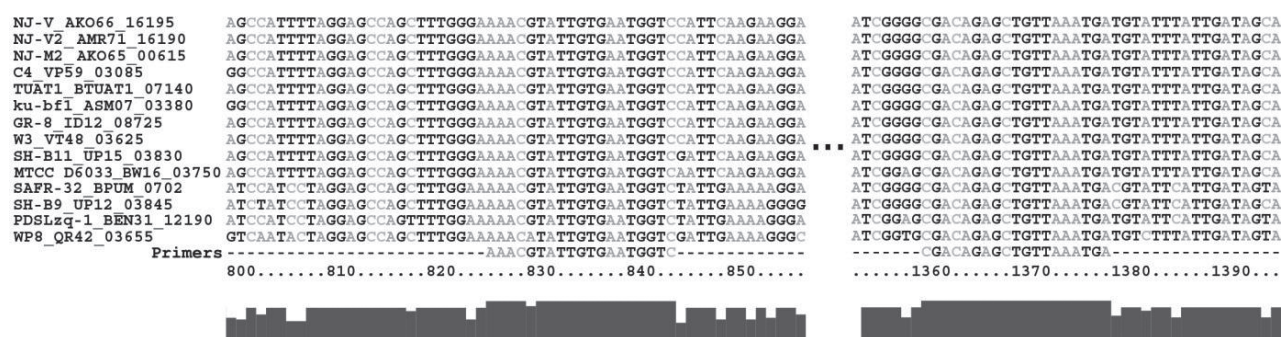


Рис. 2. Расположение пары праймеров bp05K-F и bp05K-R на участках локуса ID12_08725 и гомологичных последовательностях штаммов *B. pumilus*

Были выявлены консервативные участки, которые по своим параметрам (ГЦ-состав, расположение, длина) подходили для подбора праймеров. На рис. 1 представлены области расположения прямого и обратного праймеров bp1K на последовательности гена, кодирующего фитоин-дегидрогеназу. Регион, фланкированный bp1K-F (5'-gacttgctttgtacgtgag-3') и bp1K-R (5'-cttcaacaatccttctcgc-3'), составляет 1109 нуклеотидов. Оба праймера содержат 45% ГЦ-нуклеотидов и имеют температуру плавления 55 °C (по данным программы Primer-BLAST). На участке локуса ID12_08725 была подобрана пара олигонуклеотидов bp05K (5'-aaacgtattgtgaatgctc-3') в качестве прямого и (5'-tcatttaacagctctctgc-3') в качестве обратного праймеров, окаймляющие регион длиной 515 нуклеотидов (рис. 2). ГЦ-состав прямого и обратного праймеров составляет 36,8% и 42,1%, соответственно, разница в температуре плавления не более 1,8 °C (по данным программы Primer-BLAST). Предварительный анализ специфичности праймеров bp1K и bp05K *in silico* с помощью Primer-BLAST показал наличие продуктов амплификации только с хромосомными ДНК различных штаммов *B. pumilus*.

Сконструированные праймеры были проверены на специфичность с использованием образцов ДНК коллекционного штамма *B. pumilus* БИМ В-106, идентифицированного на основании анализа нуклеотидных последовательностей *B. pumilus* 11-1-1, а также изолятов 6-5-2, 17-2, 21-3 и 33-3, отнесенных к виду *B. pumilus* по совокупности физиолого-биохимических характеристик. Обе пары праймеров позволили получить хорошо детектируемое количество ПЦР-продукта, размер полученных ампликонов соответствовал ожидаемому, неспецифические продукты реакции отсутствовали (рис. 3).

Специфичность сконструированных праймеров дополнительно была подтверждена при использовании образцов ДНК близкородственных видов бактерий рода *Bacillus* и представителей других родов (рис. 4). В данных экспериментах вводили дополнительный положительный контроль – ПЦР с универсальными праймерами к гену 16S рРНК, позволяющий подтвердить пригодность используемой матрицы ДНК для полимеразной реакции.

Номера лунок соответствуют штаммам: 1, 9 – *B. pumilus* 11-1-1; 2, 10 – *B. pumilus* 6-5-2; 3; 11 – *B. pumilus* 17-2; 4, 12 – *B. pumilus* 21-3; 5, 13 – *B. pumilus* 33-3; 6, 14 – *B. pumilus* B106; 8 – маркер молекулярного веса ДНК; 7, 15 – отрицательный контроль

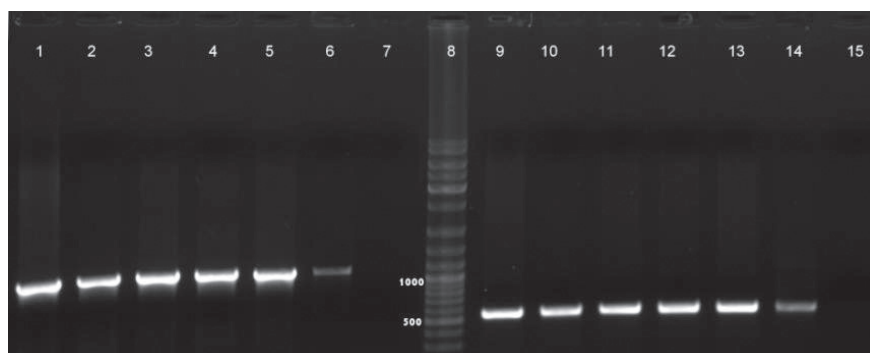
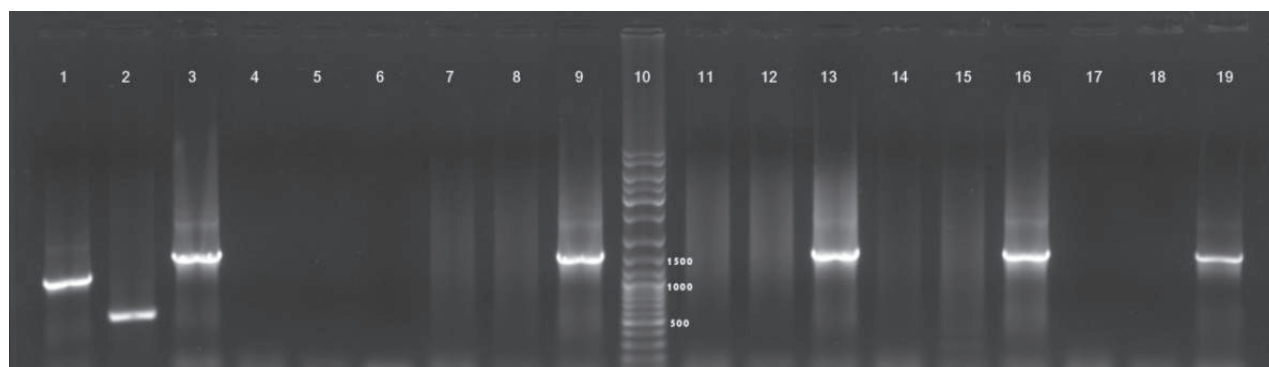


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с применением праймеров bp1K-F и bp1K-R (1-7) и bp05K-F и bp05K-R (9-15) и ДНК бактерий *B. pumilus*



1-3 – *B. pumilus* 11-1-1; 4-6 – отрицательный контроль; 7-9 – *B. thuringiensis* 787; 11-13 – *B. amyloliquefaciens* I22; 14-16 – *B. subtilis* 72; 17-19 – *B. thuringiensis* 5081; 20-22 – *Shewanella baltica*; 23-25 – *Xanthomonas campestris*; 26-28 – *Pseudomonas lundensis*; 30-32 – *Pectobacterium* sp.; 10, 29 – маркер молекулярного веса ДНК; 1, 4, 7, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 30 – праймеры bp1K-F и bp1K-R; 2, 5, 8, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 31 – праймеры bp05K-F и bp05K; 3, 6, 9, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 32 – праймеры 8f и 1492g

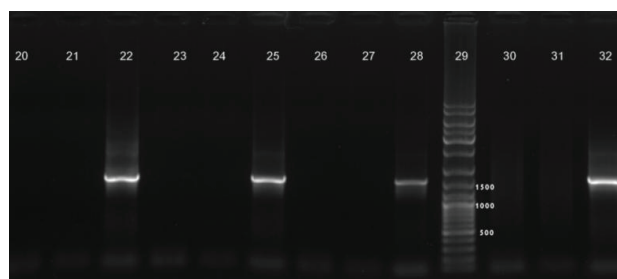
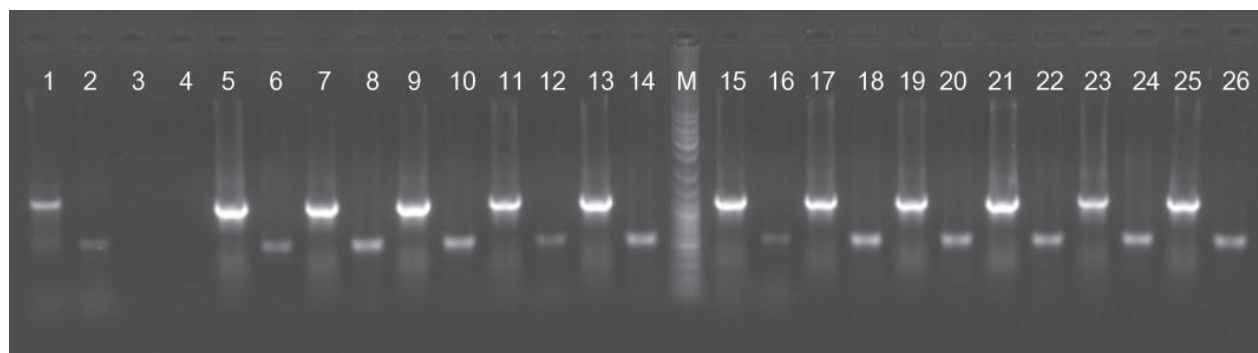


Рис. 4. Электрофореграммы продуктов ПЦР, полученные с использованием праймеров bp1K и bp05K и ДНК бактерий разных видов

Из рис. 4 видно, что продукты ПЦР с разработанными парами праймеров bp1K и bp05K были получены только при использовании в качестве матрицы ДНК *B. pumilus*, в то время как продукт амплификации гена 16S рРНК присутствовал в ПЦР смеси с ДНК-матрицами каждого образца.

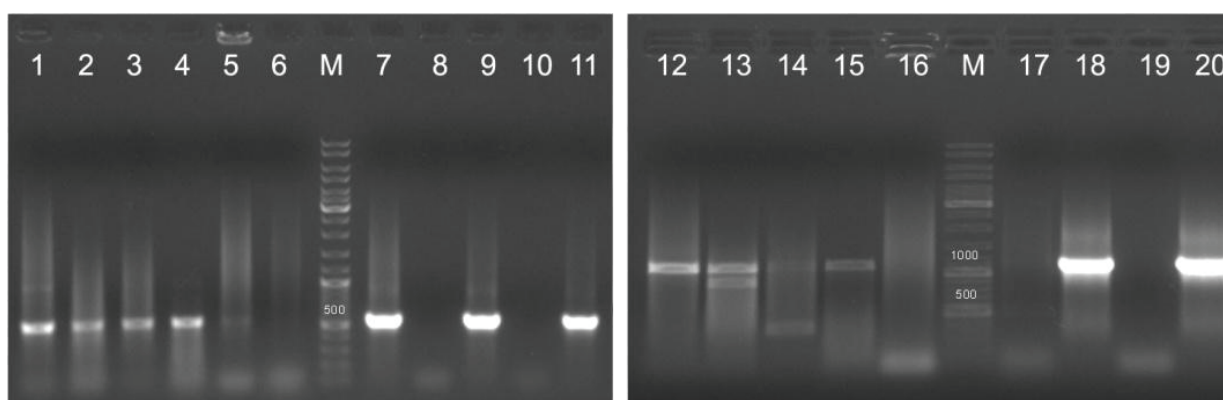
На следующем этапе работы с помощью сконструированных видоспецифичных праймеров была подтверждена таксономическая принадлежность 27 бактериальных культур, выделенных из пораженных бактериозом растений, и 7 коллекционных штаммов, отнесенных на основании морфологических и физиолого-биохимических признаков к виду *B. pumilus* (пример электрофореграммы – на рис. 5).

На заключительном этапе работы сконструированные праймеры были проверены на способность выявлять присутствие бактерий *B. pumilus* в природных образцах. Известно, что представители рода *Bacillus* являются преобладающими почвенными бактериями благодаря способности формировать устойчивые эндоспores [32]. В связи с этим, вероятность обнаружить *B. pumilus* в почве представлялась нам достаточно высокой. Для проверки этого предположения использовали 5 метагеномных препаратов ДНК, выделенных из образцов почвогрунта, собранного в различных районах г. Минска (№ 1 с территории Института микробиологии НАН Беларуси, № 2 с парковой территории Театра оперы и балета, № 3 с дворовой



1, 2 – БИМ В-106; 5, 6 – БИМ В-171; 7, 8 – БИМ В-211; 9, 10 – БИМ В-369; 11, 12 – БИМ В-373; 13, 14 – БИМ В-394; 15, 16 – БИМ В-401; 17, 18 – 43-3-1; 19, 20 – 63-1-3; 21, 22 – 63-2-2; 23, 24 – 65-4; 25, 26 – 71-4-1; 3, 4 – отрицательный контроль; М – маркер молекулярного веса ДНК; праймеры bp1K-F и bp1K-R – нечетные лунки, праймеры bp05K-F и bp05K – четные лунки

Рис. 5. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами bp1K и bp05K на матрицах ДНК бактерий *B. pumilus*



Дорожки 1–11 – праймеры bp05K; дорожки 12–20 – bp1K; номера соответствуют: 1, 12 – препарат ДНК, выделенный из образца почвы № 1; 2, 13 – препарат ДНК, выделенный из образца почвы № 2; 3, 14 – препарат ДНК, выделенный из образца почвы № 3; 4, 15 – препарат ДНК, выделенный из образца почвы № 4; 5, 16 – препарат ДНК, выделенный из образца почвы № 5; 6, 17 – смесь ДНК *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Shewanella baltica*, *B. subtilis*; 7, 18 – смесь ДНК *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Sh. baltica*, *B. subtilis*, *B. pumilus*; 8, 10, 19 – отрицательный контроль; 9, 11, 20 – ДНК *B. pumilus*

Рис. 6. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами bp1K и bp05K

территории по ул. Народная, № 5 с территории Московского кладбища) и г. Клеца (образец № 4). В качестве дополнительных контролей в этом эксперименте использовали смесь нуклеиновых кислот, искусственно созданную из препаратов ДНК, выделенных из чистых бактериальных культур, при этом в один вариант смеси вносили ДНК *B. pumilus*, а во второй – нет. Целевые продукты ПЦР были обнаружены в 4 из 5 препаратов ДНК, выделенных из почвы, а также в смеси ДНК с добавлением ДНК *B. pumilus* (рис. 6). Было выявлено, что в ходе ПЦР с метагеномной ДНК могут образовываться неспецифические продукты амплификации, однако такие продукты легко отличимы от целевых по электрофоретической подвижности.

Заключение

Сконструированы две пары праймеров bp1K и bp05K, видоспецифичных для бактерий *B. pumilus*. Специфичность разработанных праймеров подтверждена тестированием *in silico* с использованием доступных геномных последовательностей *B. pumilus*, а также экспериментально с использованием образцов ДНК чистых культур *B. pumilus* и других, в том числе близкородственных, видов бактерий и образцов метагеномной ДНК, выделенной из почвы. Сконструированные праймеры могут быть использованы для идентификации бактерий *B. pumilus* и для их экспресс-детекции в природных образцах.

Авторы выражают благодарность ассистенту кафедры микробиологии биологического факультета БГУ Комар Е.И. за предоставленные штаммы бактерий *B. pumilus*, а также м.н.с. лаборатории «ЦАГИИ» Института микробиологии НАН Беларуси Сагункевич Н.Е. за разрешение использовать препараты тотальной ДНК, выделенные из образцов почвы.

Список использованных источников

1. Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives / R. Berkeley [et al.] – Blackwell Science Ltd, 2008. – P. 133.
2. Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater / Z.-B. Guan [et al.] // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2015. – Vol. 22, N 12 – P. 9515–9523.
3. Balasubramanian, N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility / N. Balasubramanian, N. Simões // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2014. – Vol. 67 – P. 132–139.
4. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus* / Q. Huang [et al.] // *Curr. Microbiol.* – 2003. – Vol. 46, N 3 – P. 169–173.
5. De Oliveira, J.G. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources / J.G. de Oliveira, C.H. Garcia-Cruz // *Braz. Arch. Biol. Technol.* – 2013. – Vol. 56, N 1 – P. 155–160.
6. Aunpad, R. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4 / R. Aunpad, K. Na-Bangchang // *Curr. Microbiol.* – 2007. – Vol. 55, N 4 – P. 308–313.
7. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus* / C. Brack [et al.] // *Mar. Biotechnol. N.Y.N.* – 2015. – Vol. 17, N 3 – P. 290–304.
8. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of Maize under greenhouse conditions / K.B. Kuan [et al.] // *PLOS ONE.* – 2016. – Vol. 11, N 3 – P. 1–19.
9. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings / L.E. de-Bashan [et al.] // *Environ. Exp. Bot.* – 2010. – Vol. 69, N 3 – P. 343–352.
10. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use / L.H. Duc [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, N 4 – P. 2161–2171.
11. Bentur, H. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report / H. Bentur, A. Dalzell, F. Riordan // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* – 2007. – Vol. 6 – P. 12.
12. *Bacillus* spp. among hospitalized patients with haematological malignancies: clinical features, epidemics and outcomes / V. Ozkocaman [et al.] // *J. Hosp. Infect.* – 2006. – Vol. 64, N 2 – P. 169–176.
13. Cutaneous infection due to *Bacillus pumilus*: report of 3 cases / D. Tena [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 44, N 4 – P. 40–42.
14. Galal, A.A. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants / A.A. Galal, A.A. El-Bana, J. Janse // *Egypt J. Phytopathol.* – 2006. – Vol. 34, N 1 – P. 17–19.
15. Association of a bacillus species with leaf and twig dieback of Asian pear (*Pyrus Pyrifolia*) in China / B. Li [et al.] // *J. PLANT Pathol.* – 2009. – Vol. 91, N 3 – P. 705–708.
16. Peng, Q. *Bacillus pumilus*, a novel ginger rhizome rot pathogen in China / Q. Peng, Y. Yuan, M. Gao // *Plant Dis.* – 2013. – Vol. 97, N 10 – P. 1308–1315.
17. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain / M.I. Font [et al.] // *Plant Pathol.* – 2010. – Vol. 59, N 2 – P. 400.
18. Kotan, K. R. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey / K.R. Kotan, F. Sahin, A. Ala // *J. Plant Dis. Prot.* – Vol. 113, N 1 – P. 8–13.
19. Bathily, H. *Bacillus pumilus* a new pathogen on potato tubers in Mali / H. Bathily, A.H. Babana, F. Samaké // *South Afr. J. Econ.* – 2010. – Vol. 4, N 20 – P. 2067–2071.
20. Комар, Е.И. Характеристика возбудителей бактериальных гнилей картофеля на территории Беларуси / Е.И. Комар, А.Г. Песнякевич // *Вестник БГУ. Серия 2.* – 2013, № 1 – С. 54–60.
21. Kovaleva, V. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine: Short Communica-

- tion / V. Kovaleva // J. For. Sci. – 2015. – Vol. 61, N 3 – P. 131–137.
22. Specific oligonucleotide primers for detection of endoglucanase positive *Bacillus subtilis* by PCR / S. Ashe [et al.] // 3 Biotech. – 2014. – Vol. 4, N 5 – P. 461–465.
23. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2012. – Vol. 13 – P. 134.
24. Wilson, K. Preparation of genomic DNA from bacteria : 2 / K. Wilson // Curr. Protoc. Mol. Biol. – 2001 – P. 2.4.1–2.4.5.
25. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements / A.C.E. Darling [et al.] // Genome Res. – 2004. – Vol. 14, N 7 – P. 1394–1403.
26. Clustal W and Clustal X version 2.0 / M.A. Larkin [et al.] // Bioinforma. Oxf. Engl. – 2007. – Vol. 23, N 21 – P. 2947–2948.
27. Kibbe, W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator / W.A. Kibbe // Nucleic Acids Res. – 2007. – Vol. 35, N 2 – P. 43–46.
28. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis / S. Turner [et al.] // J. Eukaryot. Microbiol. – 1999. – Vol. 46, N 4 – P. 327–338.
29. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity / J. García-Martínez [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 1999. – Vol. 36, N 1–2 – P. 55–64.
30. Горовик, Ю.Н. ПЦР-диагностика бактерий *Bacillus pumilus* / Ю.Н. Горовик, А.Л. Лагоненко, А.Н. Евтушенков // Труды БГУ. Ч. 1. – 2014. – Т. 9 – С. 162–166.
31. Комар, Е.И. Идентификация грам-отрицательных пектолитических фитопатогенных бактерий, вызывающих заболевания картофеля в Беларуси / Е.И. Комар, М.И. Шавель, А.Г. Песнякевич // Вестник БГУ. Серия 2. – 2014. – № 2 – С. 54–60.
32. Amin, M. Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties / M. Amin, Z. Rakhisi, A.Z. Ahmady // Avicenna J. Clin. Microbiol. Infect. – 2015. – Vol. 2, N 1 – P. 1–4.

O.V. Yeudakimava, V.E. Miamin, L.N. Valentovich

IDENTIFICATION OF *BACILLUS PUMILUS* BACTERIA BY USING SPECIES-SPECIFIC PCR ASSAY

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences
Belarus, 220141, Minsk, Kuprevich str. 2

A polymerase chain reaction (PCR) assay was developed for rapid identification of *Bacillus pumilus* and from soil samples. Two pairs of primers were constructed to amplify 1149 and 553 bp DNA fragment. The specificity of the primers was tested with 7 collection strains and 27 isolates from infected plant. The PCR product was only produced with *B. pumilus* DNA. The results demonstrated that PCR with developed primers is a quick, simple and reliable method for detection and identification of *B. pumilus* bacteria.

Key words: *Bacillus pumilus*, PCR, primers.

Дата поступления статьи 3 октября 2016 г.

Н.В. Воронова, М.М. Воробьева, Д.Г. Жоров, С.В. Буга

ПРИМЕНИМОСТЬ МЕТОДА ПЦР-ПДРФ-АНАЛИЗА БАРКОДИНГ-РЕГИОНА *COI* ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ИНВАЗИВНЫХ ВИДОВ НАСЕКОМЫХ В ФАУНЕ БЕЛАРУСИ (НА ПРИМЕРЕ ТЛЕЙ РОДА *APHIS* L.)

Белорусский государственный университет
Беларусь, 220030, г. Минск, пр-т Независимости, 4

На основе нуклеотидных последовательностей баркодинг-региона *COI* разработаны ПЦР-ПДРФ-ключи для идентификации тлей *A. pomi* / *A. spiraeicola* фауны Беларуси, собранных с разных кормовых растений. Был уточнен перечень кормовых растений *A. pomi* / *A. spiraeicola* в условиях Беларуси.

Ключевые слова: тли, идентификация видов, баркод-регион, рестрикционные карты, *Aphis pomi*, *Aphis spiraeicola*

Введение

Корректная идентификация таксономической принадлежности биологических образцов в ряде случаев может иметь принципиальное значение. Видовая диагностика, т.е. достоверное отнесение объекта к тому или иному биологическому виду, линии или биотипу, играет ключевую роль при обеспечении внешнего карантина или мониторинге распространения и численности чужеродных для фауны и флоры видов вредителей или переносчиков заболеваний человека, животных и растений. В Европе особенное значение имеет мониторинг видов-инвайдеров, поскольку в последние годы наблюдается расширение их числа, рост экономического и экологического ущерба от их внедрения как в естественные, так и в культурфитоценозы [1–3].

Инвазивные виды, как правило, приводят к появлению специфических угроз для сложившихся на этой территории сообществ живых организмов [4]. В случае с насекомыми-фитофагами, расселение которых чаще всего происходит с интродукцией их кормовых растений, – это риск их перехода на другие виды растений, которые произрастают или возделываются на новой для инвайдера территории и могут оказаться пригодными для его питания. Заселение инвайдерами аборигенных растений часто сопровождается эскалацией численности вредителя, что обусловлено как отсутствием давления внутривидовой конкуренции,

так и слабым прессом со стороны хищников и патогенов [5, 6]. По этой причине распространение инвайдеров требует особого внимания со стороны исследователей.

В случае, когда морфологические ключи не предоставляют достаточной информации, как это часто бывает с сестринскими видами или при развитии внутривидового полиморфизма, наиболее точным методом для определения таксономической принадлежности насекомых признана ДНК-идентификация. Как известно, под термином «ДНК-идентификация» понимают целую группу методов и подходов, объединенных принципом использования маркерных последовательностей ДНК в качестве основы для создания того или иного рода идентификационных ключей. Наиболее известными среди методов ДНК-идентификации видов, вероятнее всего, являются ДНК-штрихкодирование (ДНК-баркодинг) и идентификация по результатам фрагментного анализа микросателлитных повторов [7–9]. Оба метода при должном выборе объекта и задач исследования демонстрируют высокую достоверность и разрешающую способность. Сложностями, ограничивающими широту их применения, особенно для решения рутинных задач, являются дороговизна реактивов, трудоемкость и необходимость наличия некоторого дорогостоящего оборудования (в частности, секвенатора). По этой причине мы предложили иной, гораз-

до более дешевый и простой в исполнении метод идентификации видов, основанный на использовании ПЦР-ПДРФ-ключей, который хорошо зарекомендовал себя в работах, связанных с установлением видовой принадлежности у рыб, и который мы также рекомендовали использовать для идентификации видов тлей. В предыдущей работе [10] мы подробно обсуждали преимущества использования этого метода для рутинной таксономии. В настоящей статье мы проанализировали возможность использования для создания ПЦР-ПДРФ-ключей иного молекулярного маркера – гена субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (*COI*), а точнее, так называемого, баркод-региона – участка гена длиной около 750 п.н. в 5'-области. Такой выбор продиктован несколькими причинами: во-первых, будучи митохондриальным, ген *COI* не имеет аллелей в геноме и интронов в структуре, что существенно снижает вероятность ложноположительных или ложноотрицательных результатов в процессе диагностики; во-вторых, последовательность гена *COI* у тлей чрезвычайно консервативна, и число гаплотипов, выявляемых у одного вида, редко достигает десяти [11, 12], что также повышает достоверность результатов, получаемых методом ПЦР-ПДРФ; в-третьих, существует несколько пар известных универсальных праймеров, позволяющих амплифицировать баркод-регион гена *COI* у тлей [13, 14]; и, в-четвертых, благодаря глобальному развертыванию проекта по ДНК-штрихкодированию жизни [15], последовательности баркод-региона многих видов тлей уже сегодня могут быть найдены в глобальной базе данных нуклеотидных последовательностей BOLD (1147 видов по состоянию на 2016 г.), что позволяет получать данные о внутривидовой вариабельности целевого участка генома и использовать эти данные для построения идентификационных ПЦР-ПДРФ-таблиц.

В качестве моделей для исследования применимости предлагаемого подхода для идентификации видов у тлей мы использовали несколько видов рода *Aphis* L., широко распространенных в Беларуси и, в ряде случаев, вызывающих затруднения при идентификации этих насекомых по морфологическим признакам. В частности, мы рассмотрели пару морфологически сход-

ных видов: *Aphis pomi* de Geer, 1773 и *Aphis spiraecola* Patch, 1914. В Беларуси *A. pomi* принадлежит к числу основных вредителей семечковых плодово-ягодных культур (особенно в питомниках), тогда как *A. spiraecola* является опасным вредителем и переносчиком возбудителей вирусных заболеваний многих плодовых культур в регионах с субтропическим климатом, который в настоящее время осуществляет активную экспансию на север [16]. В условиях Центральной Восточной Европы *A. spiraecola* повреждает целый круг плодово-ягодных и декоративных культур [17]. Учитывая высокое морфологическое сходство этих насекомых, появление недорогих молекулярных ключей для их идентификации было бы крайне желательным. Мы не включили в анализ еще один инвазивный вид рода *Aphis*, развивающийся в Беларуси на спирее, – *Aphis spiraeophaga* Müller, 1961, поскольку он может быть уверенно дифференцирован по морфологическим признакам [18].

Материалы и методы

Образцы тлей указанных видов были собраны в 2013–2015 гг. на территории Беларуси со спиреи (*Spiraea* sp.), боярышников (*Crataegus* sp.), кизильника блестящего (*Cotoneaster lucidus* Schltdl., яблонь (*Malus* sp.), груши (*Pyrus communis* L.), айвы японской (*Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach), ирги (*Amelanchier* spp.). Всего для проверки гипотезы о возможности идентификации тлей *A. pomi* и *A. spiraecola* методом ПЦР-ПДРФ было отобрано по одной особи из 44 колоний тлей.

Для выделения ДНК тлей коллективировали в 96%-ный этанол и хранили в морозильной камере при температуре –20 °С. ДНК выделяли из единичных насекомых, используя коммерческий набор DNA purification Kit (Thermo scientific), модифицировав методику производителя с учетом малого объема биоматериала и плотности покровов насекомого.

Фрагмент гена *COI*, соответствующий баркод-региону, получили в результате ПЦР с широко применяемыми универсальными праймерами LepF/LepR (ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG / TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA), используя стандартный для этих праймеров протокол [19] и Taq-полимеразу (Thermo scientific). Качество и ко-

личество ПЦР-продукта оценивали визуально в 1,5%-ном агарозном геле с использованием в качестве маркера молекулярного веса 1 Kb DNA-Ladder (Thermo scientific). Учитывая, что ген *COI* не имеет вариабельных по длине участков, положительным считали результат, при котором на электрофореграмме обнаруживался один четкий фрагмент ДНК длиной 707 п.н.

Последовательности *COI* *A. pomi* и *A. spiraeicola* получили из базы данных BOLD (www.barcodinglife.com). Всего было проанализировано 138 последовательностей *A. pomi* (Европа, Северная Америка, Азия и Австралия) и 227 последовательностей *A. spiraeicola* (Северная Америка, Африка, Азия, Австралия и Южная Америка).

Поиск сайтов рестрикции в последовательностях *COI* тлей исследуемых видов осуществили в программе BioEdit [20]. Выбор альтернатив и создание идентификационных таблиц провели вручную по результатам анализа построенных рестрикционных карт. При наличии внутривидовых гаплотипов *COI*, различающихся рестрикционными картами, все ферменты рестрикции, применение которых могло бы привести к получению вариативных результатов, исключали из идентификационных таблиц.

В качестве субстрата для выбранного фермента рестрикции использовали неочищенный продукт ПЦР. Рестрикцию проводили в строгом соответствии с протоколом производителя (BamHI (Thermo scientific)) в течение 3 ч. Результат рестрикции оценивали электрофоретически в 2,5%-ном агарозном геле, сравнением полученных фрагментов с маркером молекуляр-

ного веса, а также с исходным ПЦР-продуктом, который выступал в качестве внутреннего контроля длины анализируемого фрагмента.

Результаты и обсуждение

Для построения рестрикционных карт мы использовали информацию о сайтах узнавания всех ферментов рестрикции и их изошизомеров, доступных в соответствующих базах данных коммерческих продуктов [21]. Оказалось, что всего в последовательностях *A. pomi* и *A. spiraeicola* обнаруживаются сайты рестрикции для 44 рестриктаз, однако большинство из них совпадали. После сравнительного анализа рестрикционных карт нам удалось выбрать 11 ферментов для *A. pomi* и 8 – для *A. spiraeicola*, которые не имели сайтов узнавания в последовательностях второго вида, с которым необходимо проводить дифференциацию (рис. 1).

По нашему мнению, для альтернативной идентификации образцов *A. pomi* / *A. spiraeicola* можно использовать любую пару рестриктаз из числа приведенных в табл. 1, при этом ферменты рестрикции должны быть выбраны таким образом, чтобы каждая имела сайт узнавания в последовательности лишь одного вида. Невозможно рассчитать, что суммарное число возможных парных комбинаций равно 88.

Мы оценили эффективность использования предлагаемого подхода на практике, и установили видовую принадлежность некоторых образцов *A. pomi* / *A. spiraeicola*, коллектированных в Беларуси с разных кормовых растений, идентификацию которых методом морфометрического анализа [22] провести не удалось.

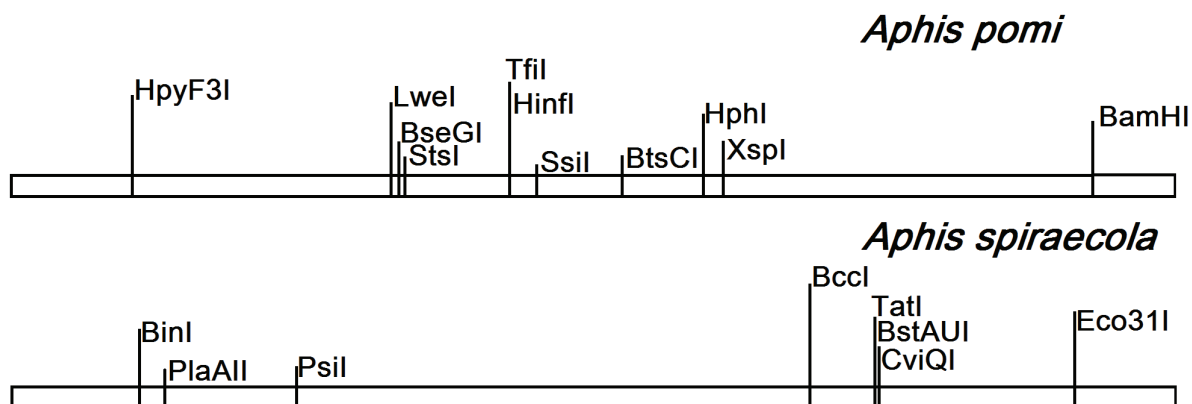


Рис. 1. Рестрикционные карты фрагмента *COI*, содержащие информацию о наличии сайтов рестрикции для набора рестрикционных ферментов, позволяющих провести альтернативную идентификацию видов *A. pomi* / *A. spiraeicola*

Таблица 1

Идентификационная ПЦР-ПДРФ-таблица для диагностики *A. pomi* / *A. spiraecola*, построенная на основе анализа баркод-региона *COI*

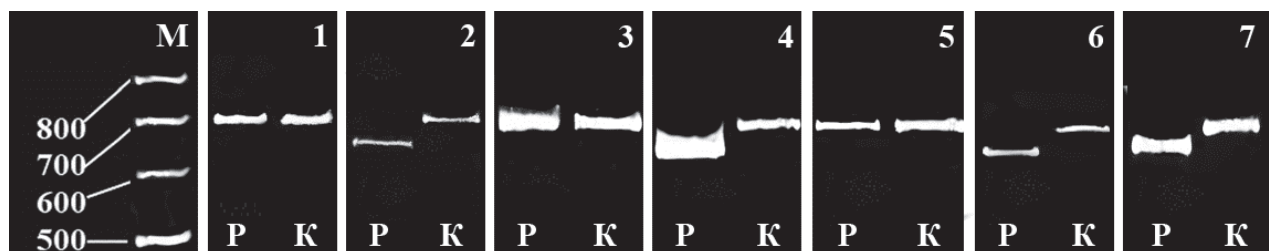
Название фермента рестрикции	Сайт узнавания фермента рестрикции	Вид тли и длина образующихся фрагментов	
		<i>Aphis pomi</i>	<i>Aphis spiraecola</i>
BamHI	G/GATCC	52 + 655	—*
BseGI	GGATG (2/0)	245 + 462	—
BtsCI	GGATG(2/0)	351 + 356	—
HinfI	G/ANTC	279 + 428	—
HphI	GGTGA(8/7)	288 + 419	—
HpyF3I	C/TNAG	74 + 633	—
Lwel	GCATC(5/9)	230 + 477	—
SsiI	CCGC(-3/-1)	293 + 414	—
StsI	GGATG	253 + 454	—
TfiI	G/AWTC	279 + 428	—
XspI	C/TAG	276 + 431	—
BccI	CCATC (4/5)	—	284 + 423
BinI	GGATC (4/5)	—	74 + 633
BstAUI	T/GTACA	—	233 + 474
CviQI	G/TAC	—	234 + 475
Eco31I	GGTCTC(1/5)	—	58 + 649
PlaAII	GT/AC	—	89 + 618
PsiI	TTA/TAA	—	171 + 536
TatI	W/GTACW	—	233 + 474

*(-) – сайт узнавания данной рестриктазы в последовательности отсутствует

После проведения ПЦР и последующей обработки ПЦР-фрагментов рестриктазой BamHI, «отрезающей» от ПЦР-продукта минимальный, в сравнении с другими предлагаемыми ферментами рестрикции, фрагмент (52 п.н.), оказалось, что различия в длине фрагментов ДНК после проведения рестрикции

хорошо визуализируются в электрофорезном геле и результаты идентификации полностью однозначны (рис. 2).

В результате мы обнаружили, что в исследованных нами сборах *A. pomi* / *A. spiraecola* представленность обоих видов примерно одинакова (табл. 2).



1 – тли, собранные с *Chaenomeles japonica*; 2 – тли, собранные с *Malus* sp.; 3 – тли, собранные со *Spiraea* sp.; 4 – тли, собранные с *Crataegus* sp.; 5 – тли, собранные с *Cotoneaster lucidus*; 6 – тли, собранные со *Spiraea* sp.; 7 – тли, собранные с *Malus* sp.; М – маркер молекулярного веса; Р – фрагмент, обработанный рестриктазой BamHI; К – фрагмент, не обработанный рестриктазой

Рис. 2. Электрофореграммы результатов ПЦР-ПДРФ-анализа, проведенного для идентификации видов *A. pomi* / *A. spiraecola* в сборах тлей с разных кормовых растений (пример)

Таблица 2

Результаты ПЦР-ПДРФ-диагностики видов тлей в образцах, собранных с разных кормовых растений (с использованием рестриктазы BamHI)

Кормовое растение	Результаты идентификации тлей	
	<i>Aphis pomi</i>	<i>Aphis spiraecola</i>
<i>Spiraea</i> sp.	1	12
<i>Crataegus</i> sp.	6	3
<i>Cotoneaster lucidus</i>	8	3
<i>Malus</i> sp.	4	0
<i>Pyrus communis</i>	2	0
<i>Chaenomeles japonica</i>	0	3
<i>Amelanchier</i> sp.	0	2
Суммарное количество для всех растений	21	23

При оценке встречаемости *A. pomi* и *A. spiraecola* на конкретных кормовых растениях с уверенностью можно заключить, что только на спиреях преобладают *A. spiraecola*. В остальных случаях, учитывая ограниченный размер выборки, обоснованных заключений о преимущественной связи каждого (или какого-то одного) вида тлей с конкретным кормовым растением сделать нельзя.

Заключение

Оценка применимости и эффективности метода ПЦР-ПДРФ для идентификации тлей рода *Aphis* L. на яблонях, спиреях и других кормовых растениях, на которых в Беларуси регистрируются *A. pomi* / *A. spiraecola*, показала, что последовательность COI (баркод-регион) этих видов тлей обладает достаточной консервативностью на внутривидовом и вариабельностью на межвидовом уровнях, чтобы можно было разработать ПЦР-ПДРФ-ключи для идентификации этих двух видов.

На основе предлагаемого нами списка рестрикционных ферментов можно составить 88 ПДРФ-ключей, позволяющих идентифицировать виды *A. pomi* и *A. spiraecola* по альтернативному принципу.

С использованием предлагаемого подхода и произвольно выбранного из числа возможных ключа мы оценили встречаемость *A. pomi* / *A. spiraecola* в Беларуси на нескольких кормовых растениях, причем оказалось, что на спиреях почти исключительно преобладают *A. spiraecola*.

Авторы выражают искреннюю благодарность заведующему кафедрой микробиологии БГУ, профессору, д.б.н. В.А. Прокулевичу за помощь в получении результатов.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б15-063), а также гранта Министерства образования Республики Беларусь на выполнение НИР аспирантами и авторскими коллективами студентов на 2016 г.

Список использованных источников

1. Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences / J.R. Garnas [et al.] // Biological Invasions. – 2016. – Vol. 18, N. 4. – P. 935–952.
2. Genetic Diversity and Structure of Brazilian Populations of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): Implications for Pest Management / K.L. Silva-Branda [et al.] // Journal of Economic Entomology. – 2015. – Vol. 108, N. 1. – P. 307–316.
3. Global Invasive Species Programme (GISP), 1999 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://jasper.stanford.edu/gips/>. – Date of access: 01.10.2016.
4. Воробьева, М.М. Предварительные результаты изучения уровня генетического сходства инвазивных и аборигенных популяций алычовой тли (*Brachycaudus divaricatae* Shap., 1956) / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова, С.В. Буга // Вестник БГУ. Серия 2. – 2015. – № 3. – С. 49–55.

5. Harizanova, V. Preliminary study on the invasive *Acizzia jamatonica* (Hemiptera: Psyllidae) and its predators in Bulgaria / V. Harizanova, A. Stoeva, M. Mohamedova // Agricultural Science and Thechnology. – 2012. – Vol. 4 (1). – P. 56–61.
6. *Epuraea imperialis* (Reitter, 1877) new invasive species of nitidulidae (Coleoptera) in Europe, with a checklist of sap beetles introduced to Europe and Mediterranean areas / J. Jelinek [et al.] // Atti della Accademia Peloritana dei Pericolanti. – 2016. – Vol. 94 (2). – P. 1–24.
7. Biological indentifications through DNA barcodes / P.D.N. Hebert [et al.] // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2003. – Vol. 270. – P. 313–321.
8. Identification of aphid species (Hemiptera: Aphididae: Aphidinae) using a rapid polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method based on the cytochrome oxidase subunit I gene / I. Valenzuela [et al.] // Australian Journal of Entomology. – 2007. – Vol. 46. – P. 305–312.
9. Identification of the population structure of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on peach trees in China using microsatellites / J. Li [et al.] // Journal of Insect Science. – 2015. – Vol. 15, N. 1. – P. 2–9.
10. Воронова, Н.В. Разработка ПЦР-ПДРФ таблиц на основе последовательности гена *EF1a* для идентификации видов тлей – вредителей сельскохозяйственных растений / Н.В. Воронова, В.И. Головенчик // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2015. – Т. 19. – С. 100–109.
11. Воробьева, М.М. Генетическая структура вида *Macrosiphum gei* Koch, 1855 в Беларуси / М.М. Воробьева, П.К. Супранович, Н.В. Воронова // Факторы экспериментальной эволюции: материалы XI Междунар. научно-практич. конф., 12–16 сент. 2016 г. / Одесский национальный ун-т им. И.И. Мечникова (ОНУ). – Одесса, 2016. – С. 36–41.
12. Воробьева, М.М. Генетическая вариабельность аборигенных и инвазивных видов тлей родов *Macrosiphum* Pass. и *Brachycaudus* van der Goot / М.М. Воробьева, П.К. Супранович, Н.В. Воронова // Труды БГУ. – 2014. – Т. 8, Ч. 2. – С. 135–142.
13. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes / R.G. Footitt [et al.] // Molecular ecology resources. – 2008. – Vol. 8, N. 6. – P. 1189–1201.
14. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // Molecular Biology and Biotechnology. – 1994. – Vol. 3, N. 5. – P. 294–299.
15. DNA barcoding and the associated PhylAphidB@se website for the identification of European aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) / A. Coeur d'Acier [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N. 6. – P. 1–16.
16. Blackman, R.L. Aphids of the world trees. An identification and information guide / R.L. Blackman, V.F. Eastop. – London: CAB International, 1994. – 1024 p.
17. Holman, J. Host plant catalog of aphids. Palaearctic region / J. Holman. – Berlin: Springer Science, 2009. – 1216 p.
18. Горленко, С.В. Устойчивость древесных интродуцентов к биотическим факторам / С.В. Горленко, А.И. Блинцов, Н.А. Панько. – Минск: Наука и техника, 1988. – 189 с.
19. DNA barcodes distinguish species of tropical *Lepidoptera* / M. Hajibabaei [et al.] // PNAS. – 2006. – Vol. 103. – P. 968–971.
20. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T.A. Hall // Nucleic acids Symposium series. – 1999. – N. 91. – P. 95–98.
21. Roberts, J.R. Restriction enzymes and their isoschizomers / J.R. Roberts // Nucleic Acids Research. – 1988. – Vol. 16. – P. 271–313.
22. Жоров, Д.Г. Проблема морфометрической идентификации зеленых тлей рода *Aphis* L., повреждающих деревья и кустарники семейства Rosaceae в зеленых насаждениях Беларуси / Д.Г. Жоров // Вестник БГУ. Серия 2. – 2016. – № 2. – С. 67–74.

N.V. Voronova, M.M. Varabyova, D.G. Zhorov, S.V. Buga

**APPLICABILITY OF PCR-RFLP KEYS BASED ON *COI* BARCODE
REGION FOR THE IDENTIFICATION OF INVASIVE SPECIES
IN THE INSECT FAUNA OF BELARUS (ON EXAMPLE OF APHIDS
OF GENUS *APHIS* L.)**

Belarusian State University
Belarus, 220030, Minsk

PCR-RFLP keys based on *COI* barcode region for the identification of *A. pomi* / *A. spiraeicola* samples collected from different host-plants in Belarus were developed. The list of *A. pomi* / *A. spiraeicola* fodder plants in the Belarusian conditions has been updated.

Key words: aphids, species identification, barcode region, restriction map, *Aphis pomi*, *Aphis spiraeicola*

Дата поступления статьи 10 октября 2016 г.

Е.А. Аксенова, А.П. Сильванович, А.В. Михайловская, Н.Г. Даниленко

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D В ПОПУЛЯЦИЯХ ЭТНИЧЕСКИХ БЕЛОРУСОВ

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

Изучена частота встречаемости полиморфных аллелей *ApaI* (A/a) (rs7975232), *TaqI* (T/t) (rs731236), *BsmI* (B/b) (rs1544410), *FokI* (F/f) (rs2228570) гена рецептора витамина D (*VDR*) в выборках 762 белорусов шести этногеографических регионов. Общая частота генотипов по изученным локусам следующая: 46,3% – TT; 41,1% – Tt; 12,6% – tt для локуса rs731236; 34,8% – AA; 41,5% – Aa; 23,7% – aa для локуса rs7975232; 17,9% – BB; 50,7% – Bb; 31,4% – bb для локуса rs1544410; 29,1% – FF; 50,3% – Ff; 20,6% – ff для rs2228570 локуса. Самым с распространенным (8,9%) во всей выборке был гетерозиготный генотип TtAaBbFf. Обнаружены достоверные различия по распределению частот изученных генотипов и аллелей гена *VDR* между регионами: генотип ttAABBff гена *VDR*, связанный с экспрессией менее активной формы рецептора, обнаружен у 1,6% исследованных белорусов, а более благоприятный генотип TTaabbFF – у 3,4%.

Ключевые слова: рецептор витамина D, полиморфизм гена *VDR*, популяционные частоты аллелей у белорусов.

Введение

Активная форма витамина D₃ (кальцитриол) – 1,25-дигидроксивитамин D₃ (1,25-(OH)₂D₃) – вовлечена в функционирование различных систем организма и относится к группе стероидных гормонов. Основываясь на данных протеомики, полученных в последние годы, исследователи считают, что 1,25-(OH)₂D₃ регулирует, прямо или косвенно, более двухсот генов (0,5–5% от всего генома) и вовлечен в разнообразные клеточные процессы, включая регуляцию роста, ДНК-репарацию, дифференциацию, апоптоз, мембранный транспорт, метаболизм, клеточную адгезию, оксидативный стресс [1, 2]. Существует пять вариантов химических веществ, называемых витамином D, однако обычно подразумеваются два: D₂ – эргокальциферол – выделяется из дрожжей (его предшественник – эргостерин) и D₃ – холекальциферол, который выделяется из тканей животных (предшественник – 7-дегидрохолестерол). 1,25-дигидроксивитамин D₃ (1,25-(OH)₂D₃) образуется в митохондриях клеток почек под действием 1α-гидроксилазы. Затем он транспортируется по кровяному руслу к клеткам-мишеням, где связывается со своим рецептором, который запускает экспрессию генов транспортных белков ионов кальция, и таким образом регулируется

уровень кальция в крови [3]. Белок-рецептор витамина D (*VDR*) состоит из 427 аминокислот. Анализ его молекулярной структуры и функции доменов позволяет однозначно отнести его к классу ядерных транскрипционных факторов (NR) [4]. Ген, кодирующий *VDR* у человека, расположен на 12-ой хромосоме (12q13.11) и состоит из 14 экзонов общей длиной 75 т.п.н. и, по крайней мере, пяти промоторных участков [5, 6]. Шесть первых экзонов (1A–1F) составляют 5'-нетранслируемый район и подвергаются альтернативному сплайсингу, экзоны 2 и 3 представляют собой ДНК-связывающий домен, экзоны 4–9 – лиганд-связывающий домен [7]. Экспрессия гена контролируется на транскрипционном уровне с помощью множественных тканеспецифических промоторов, а также посттрансляционно [5, 6, 8]. Подобная экзонная структура и общая организация гена сходны со многими другими известными генами стероидных рецепторов, включая тиреоидный рецептор, прогестероновый рецептор, эстрогенный и андрогенный рецепторы и глюкокортикоидный рецептор [5, 9].

Нечастые патогенные мутации в гене *VDR* приводят к давно описанному рахиту II типа (1,25-дигидроксивитамин-D-резистентному рахиту) – редко встречающемуся заболева-

нию, которое характеризуется остеомалацией, алопецией и повышенными уровнями активной формы витамина D ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) [10, 11, 12]. Помимо этих редких мутаций, в гене *VDR* описано большое количество однонуклеотидных замен (SNP), встречающихся в популяциях с большой частотой, т.е. относящихся к полиморфным вариантам генетического контекста [13–15]. К настоящему времени в гене *VDR* выявлено более 500 однонуклеотидных замен [16], однако наиболее интенсивно исследуется связь между различными патологическими состояниями человека и четырьмя однонуклеотидными заменами: несинонимической *FokI* и синонимическими *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* (рис. 1).

Эти исследования начаты в 90-ые годы и к настоящему моменту исчисляются сотнями.

Аналізу подвергаются особенности течения в зависимости от аллельного состояния *VDR* таких разных групп заболеваний, как аутоиммунные (диабет 1 типа, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, неспецифический язвенный колит и другие) [18–22], инфекционные (чаще всего туберкулез) [23], метаболические (остеопороз, мочекаменная болезнь) [24–27], нейродегенеративные (болезни Паркинсона и Альцгеймера) [28, 29] и онкологические различной локализации [30, 31].

Исследование популяционных частот способствует более корректной оценке вклада полиморфных генотипов гена *VDR* в этиологию этих заболеваний. Частота встречаемости полиморфных аллелей гена *VDR* в популяции Беларуси ранее не изучалась. Целью нашего исследования было изучение особенностей распределения частот полиморфных аллелей *ApaI* (A/a) (rs7975232), *TaqI* (T/t) (rs731236),

BsmI (B/b) (rs1544410), *FokI* (F/f) (rs2228570, ранее известный как rs10735810) гена рецептора витамина D в популяциях этнических белорусов.

Материалы и методы

Материалом исследования служили данные ДНК-банка этнических белорусов, проживающих в шести этногеографических регионах Беларуси, собранные сотрудниками лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН Беларуси (Кушнеревич Е.И., Сивицкой Л.Н., Даниленко Н.Г. и Давыденко О.Г.) в 2004–2006 гг.

Для генотипирования полиморфных аллелей *BsmI* (B/b), *ApaI* (A/a), *TaqI* (T/t) и *FokI* (F/f) гена рецептора витамина D (*VDR*) использовались пары праймеров, синтезированные в ОДО «Праймтех» (г. Минск) (табл. 1).

Полимеразная цепная реакция проводилась на амплификаторах MyCycler™ (BIORAD) MJMini (BIORAD) с использованием специально подобранной программы: начальная денатурация при 94 °C – 4 мин, 35 циклов: денатурация 94 °C – 20 с, отжиг 60 °C – 40 с, элонгация 72 °C – 40 с, затем финальная элонгация при 72 °C – 4 мин и хранение при 12 °C.

Продукты амплификации подвергались обработке соответствующими эндонуклеазами (Fermentas/Thermo Fisher Scientific) с последующим электрофоретическим разделением в 6%-ном полиакриламидном неденатурирующем геле. Визуализация проводилась в УФ-свете после окрашивания в водном растворе бромистого этидия на приборе для гель-документирования (Vilber Lourmat).

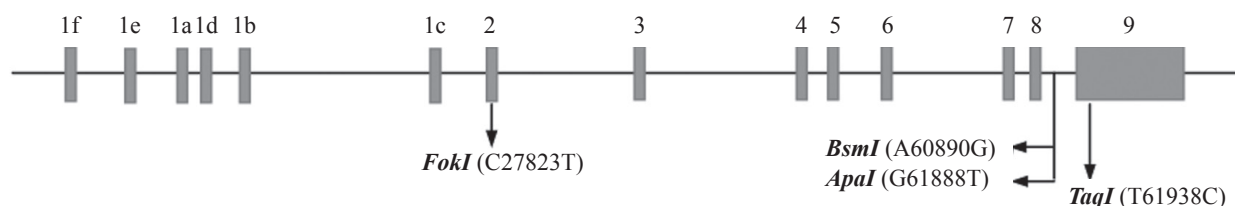


Рис. 1. Схема экзонной структуры гена рецептора витамина D (*VDR*) с локализацией однонуклеотидных полиморфных локусов *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*, получивших свои названия соответственно узнаванию ферментами рестрикции. В скобках указаны нуклеотидные замены [цит. по 17]

Таблица 1

Праймеры и размеры фрагментов полиморфных аллелей *BsmI* (B/b), *ApaI* (A/a), *TaqI* (T/t) и *FokI* (F/f) гена рецептора витамина D (*VDR*) при ПЦР-ПДРФ-анализе

Локус	Последовательность праймеров	Источник	Размер фрагментов соответствующего аллеля при ПЦР-ПДРФ-анализе
<i>ApaI</i>	F 5'-GTATCACCGGTCAGCAGTCATAGA-3' R 5'-TGTACGTCTGCAGTGTGTTGGA-3'	[24]	(A) – 217 п.о. (a) – 120 и 97 п.о.
<i>TaqI</i>	F 5'-GTATCACCGGTCAGCAGTCATAGA-3' R 5'-TGTACGTCTGCAGTGTGTTGGA-3'	[24]	(T) – 217 п.о. (t) – 168 и 49 п.о.
<i>BsmI</i>	F 5'-GTGTGCAGGCGATTCGTA R 5'-TACCCTGCCCCGAAGAAA	[32]	(B) – 155 п.о. (b) – 82 и 73 п.о.
<i>FokI</i>	F 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCTCT R 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCCCTC	[32]	(F) – 267 п.о. (f) – 204 и 63 п.о.

Сравнение эмпирических распределений частот проводилось с использованием программы AB-Stat по методу Хи-квадрат без поправки на непрерывность Йейтса по формуле [33]:

$$\chi^2 = \frac{1}{n_1 n_2} \sum \frac{(f_1 n_2 - f_2 n_1)^2}{f_1 + f_2},$$

где f_1 и f_2 – частоты, а n_1 и n_2 – численность выборок. Этногеографические карты строили при помощи программы Surfer 7.0.

Результаты и обсуждение

Изучена частота встречаемости полиморфных аллелей *ApaI* (A/a) (rs7975232), *TaqI* (T/t) (rs731236), *BsmI* (B/b) (rs1544410), *FokI* (F/f) (rs2228570) гена рецептора витамина D (*VDR*) в выборках белорусов из шести регионов страны. Частоты генотипов и аллелей по изученным локусам представлены в табл. 2 и 3. До-

стоверных различий по распределению частот изученных генотипов и аллелей *TaqI* и *FokI* локусов гена *VDR* между регионами обнаружено не было. Частоты генотипов *ApaI* популяций Центрального региона и Поднепровья (Восток) достоверно отличались от всех регионов, за исключением выборки популяции Подвинья (Север) (табл. 2). Также частота аллелей локуса *ApaI* гена *VDR* популяции Поднепровья (Восточного региона) достоверно отличалась от популяций остальных регионов (табл. 3). Частоты аллелей локуса *BsmI* гена *VDR* популяций Севера и Востока (Поднепровья и Подвинья), а также Центра, достоверно отличались от популяций Юга и Запада (Полесья и Понёманья) (табл. 3). Полученные нами результаты согласуются с данными по аллельным частотам у представителей европеоидной расы, полученных другими исследователями (табл. 4).

Таблица 2

Частоты генотипов *BsmI* (B/b), *ApaI* (A/a), *TaqI* (T/t), *FokI* (F/f) гена рецептора витамина D (*VDR*)

Регион	Частоты генотипов, %											
	TT	Tt	tt	AA	Aa	aa	BB	Bb	bb	FF	Ff	ff
Центральный (121 человек)	41,7	46,7	11,7	39,5	30,25	30,25	20,3	53,7	26,0	31,1	48,7	20,2
Восток (Поднепровье) (123 чел.)	50,0	40,2	9,8	45,5*	38,4*	16,1*	23,6	58,5	17,9	30,2	44,8	25,0
Восточное Полесье (128 чел.)	45,2	42,9	11,9	31,0 ^a	42,0 ^a	27,0 ^a	14,2	44,9	40,9	33,9	48,0	18,1
Западное Полесье (158 чел.)	46,0	39,3	14,7	30,8* ^a	46,8* ^a	22,4* ^a	16,6	40,1	43,3	27,5	51,0	21,5
Запад (Понёманье) (101 чел.)	47,5	43,4	9,1	28,3** ^a	52,5** ^a	19,2** ^a	12,2	44,9	42,9	19,6	59,8	20,7
Север (Подвинье) (131 чел.)	48,1	35,1	16,8	34,6	39,1	26,3	19,8	63,4	16,8	30,1	51,1	18,8
Всего	46,3	41,1	12,6	34,8	41,5	23,7	17,9	50,7	31,4	29,1	50,3	20,6

* – статистически значимые отличия от данных для Центра при $P < 0,05$; ** – статистически значимые отличия от данных для Центра при $P < 0,01$; ^a – статистически значимые отличия от данных для Поднепровья (Восток) при $P < 0,05$

На рис. 2 представлены карты распределения частот «благоприятных» для показателей минеральной плотности костей генотипов *ApaI* (aa) (rs7975232), *TaqI* (TT) (rs731236),

BsmI (bb) (rs1544410), *FokI* (FF) (rs2228570) гена рецептора витамина D (*VDR*) у белорусов из 18 мест сбора проб, относящихся к шести этногеографическим регионам.

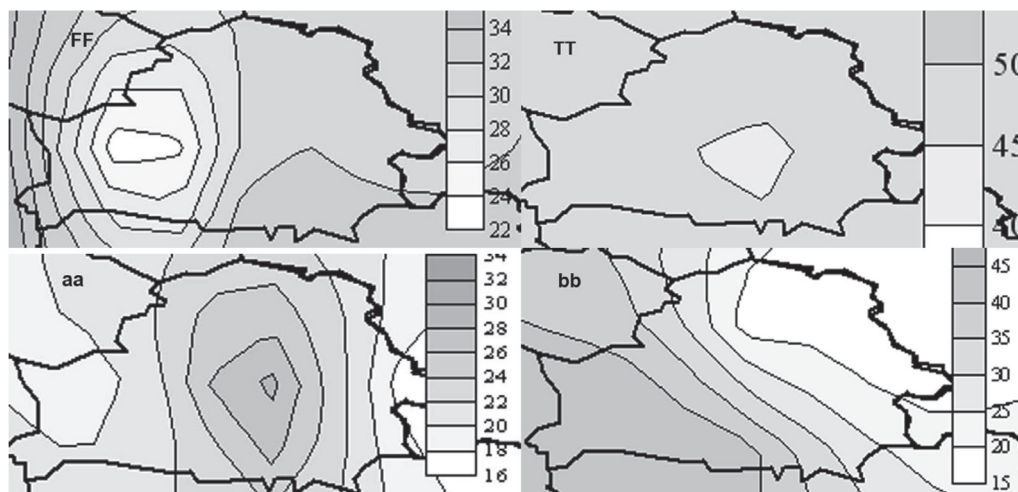


Рис. 2. Карты распределения частот генотипов *ApaI* (aa) (rs7975232), *TaqI* (TT) (rs731236), *BsmI* (bb) (rs1544410), *FokI* (FF) (rs2228570) гена рецептора витамина D (*VDR*) у белорусов из 18 мест сбора проб шести этногеографических регионов

Таблица 3

Частоты аллелей *BsmI* (B/b), *ApaI* (A/a), *TaqI* (T/t), *FokI* (F/f) гена рецептора витамина D (*VDR*)

Регион	Частоты аллелей, %							
	T	t	A	a	B	b	F	f
Центральный	65,0	35,0	54,6	45,4	47,2	52,8	55,5	44,5
Восток (Поднепровье)	70,1	29,9	64,7*	35,3*	52,8	47,2	52,6	47,4
Восточное Полесье	66,7	33,3	52,0 ^{aa}	48,0 ^{aa}	36,6*/aa/bb	63,4*/aa/bb	57,9	42,1
Западное Полесье	65,7	34,3	54,2 ^a	45,8 ^a	36,6*/aa/bb	63,4*/aa/bb	53,0	47,0
Запад (Понёманье)	69,2	30,8	54,5 ^a	45,5 ^a	34,7**/aa/bb	65,3**/aa/bb	49,5	50,5
Север (Подвинье)	65,6	34,4	54,1 ^a	45,9 ^a	51,5	48,5	55,6	44,4
Всего	66,9	33,1	55,5	44,5	43,3	56,7	54,2	45,8

* – статистически значимые отличия от данных для Центра при $P < 0,05$; ** – статистически значимые отличия от данных для Центра при $P < 0,01$; ^a – статистически значимые отличия от данных для Поднепровья (Восток) при $P < 0,05$; ^{aa} – статистически значимые отличия от данных для Поднепровья (Восток) при $P < 0,01$; ^{bb} – статистически значимые отличия от данных для Подвинья (Север) при $P < 0,01$

Таблица 4

Частоты генотипов *BsmI* (B/b), *ApaI* (A/a), *TaqI* (T/t), *FokI* (F/f) гена рецептора витамина D (*VDR*) в контрольных выборках здоровых людей разных стран

Страна	n	Частоты генотипов, %												Источ- ник
		AA (TT)	Aa	aa (GG)	TT (TT)	Tt	tt (CC)	BB (AA)	Bb	bb (GG)	FF (CC)	Ff	ff (TT)	
Европеоидная раса														
Финляндия	2379	32,3	49,2	18,5	–	–	–	12,8	41,7	45,5	39,9	47,8	13,3	[34]
Ирландия	674	29.7	47.8	22.5	36.9	48.5	14.6	16.5	48.2	35.2	38.9	46.1	15	[35]

Продолжение табл. 4

Страна	n	Частоты генотипов, %												Источ- ник
		AA (TT)	Aa	aa (GG)	TT (TT)	Tt	tt (CC)	BB (AA)	Bb	bb (GG)	FF (CC)	Ff	ff (TT)	
Европеоидная раса														
Польша	142	25,4	34,5	40,1	48,6	34,5	16,9	23,9	41,5	34,5	58,5	29,6	12,0	[31]
Франция	100	—	—	—	34,7	51,6	13,7	13,5	50	36,5	30	48	22	[20]
	189	—	—	—	—	—	—	17	51	32	—	—	—	[36]
Италия	214	26	54	20	40	46	14	20	50	30	32	44	24	[27]
	424	—	—	—	—	—	—	—	—	—	33,2	32,8	34,0	[37]
	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	41	45	14	[38]
Турция	130	23,85	56,15	20	37,69	45,38	16,92	16,92	50	33,08	47,69	42,31	10	[39]
Венгрия	103	32	43	25	41	27	32	16	50	34	34	46	20	[18]
Мальта	104	—	—	—	—	—	—	16,4	51,9	31,7	60,4	30,7	8,9	[40]
Испания	274	—	—	—	—	—	—	17	54	29	38	52	10	[41]
	116	—	—	—	—	—	—	16	46	38	35	46	19	[32]
	120	—	—	—	—	—	—	13,4	55,8	30,8	—	—	—	[26]
	143	32,2	46,8	21	37,1	44	18,9	—	—	—	36,4	45,4	18,2	[42]
Россия	138	—	—	—	45,6	43,5	10,9	—	—	—	—	—	—	[43]
	179	—	—	—	41,3	44,7	14	—	—	—	—	—	—	[44]
	60	—	—	—	—	—	—	—	—	—	35	45	20	[46]
	113	—	—	—	—	—	—	17,6	58,3	24,1	37,2	47,8	15	[45]
Россия татары	55	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25,5	54,5	20	[46]
Ливия	539	37,1	48,8	14,1	34,3	49,9	15,8	18,5	49,4	32,1	—	—	—	[47]
Аргентина	110	33,9	41,3	24,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	[48]
Монголоидная														
Россия башкиры	70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	51,4	40,0	8,6	[46]
Россия тувинцы	263	—	—	—	—	—	—	0,8	33,4	65,8	56,3	37,3	6,5	[45]
Китай	156	8,3	28,2	64,5	44,2	19,9	31,9	—	—	—	—	—	—	[49]
	204	11,8	35,3	52,9	91,7	8,3	0	0	9,8	90,2	33,8	47,6	18,6	[50]
	523	12	41	47	90	9	1	0	10	90	29	51	20	[51]
Монголия	72	16	46	38	86	13	1	1	13	86	—	—	—	[52]
Тайвань	169	9	43	48	92	8	0	0	9	91	—	—	—	[30]
Япония	80	47,5	41,3	11,3	—	—	—	0	18,8	81,2	18,8	50	31,2	[32]
Негроидная														
Нигерия	94	47	36	17	53	42	5	15	44	41	58	32	10	[53]

Примечание. n – размер выборки (количество исследованных человек)

Для локуса *FokI* характерна Т/С транзиция в старт-кодоне (ATG) второго экзона гена *VDR*, при которой уменьшается длина белковой молекулы рецептора за счет смещения старт-кодона на три триплета. В случае тимина (Т) или “F”-аллеля синтезируется М1 форма молекулы из 427 аминокислот, а в случае цитозина (С) или “F”-аллеля синтезируется более короткая и, соответственно, более активная М4-форма рецептора длиной 424 аминокислоты [15; 54].

По данным исследователей США, у детей, носителей генотипа FF минеральная плотность костей (МПК) была в среднем на 8,2% выше, чем у обладателей рецессивного гомозиготного генотипа (ff) и на 4,8% выше, чем у детей с генотипом Ff [55]. Переломы из-за хрупкости костей и позвоночника чаще случались у французских женщин в постменопаузальном возрасте, имеющих генотип BB *BsmI* ($OR = 2,10$ (95% CI 1,16–3,79)) [56]. При исследовании этниче-

ских немцев с остеопорозными переломами не обнаружено людей с генотипом *bb BsmI* [57]. Итальянские женщины с генотипом *AABBtt* имели на 13% меньшую МПК в поясничном отделе позвоночника, чем женщины с генотипом *aabbTT* [28]. Однако при обследовании жителей Финляндии в связи с риском остеоартроза показано, что носители гаплотипа *aT* при низком потреблении кальция имеют более высокие шансы ($OR = 2,64$ ($95\% CI = 1,29-5,40$)) на развитие остеоартроза кисти [25]. Также обнаружена связь гаплотипа *BAt* с предрасположенностью к диабету 1 типа у немцев [19].

Нами было проведено сопоставление частот встречаемости сочетаний генотипов по всем изученным полиморфным локусам. Всего было выявлено 54 сочетания генотипов из 61 возможного. Наиболее распространенные представлены в табл. 5. Не обнаружено следующих сочетаний генотипов: *ttAaBbff*, *ttAabbff*, *ttaaBbff*, *ttAaBBff*, *TtaaBbff*, *TtAabbff*, *ttAaBbFf*.

Самый распространенный гетерозиготный генотип *TtAaBbFf* встречается у 8,9% проанализированной выборки. Однако при сравнении регионов данный генотип преобладал только в Западном Полесье (12,6%). Во всех остальных популяциях преобладали разные генотипы. *TtAABbFf* – в Центральном регионе (9,9%); *TTaabbff* – в Восточном (7,4%); *TTaabbFf* – в Восточном Полесье (12,8%); *TTAabbFf* – в Западном (16,1%); *TTaBbFf* – в Северном (9,3%). Гетерозиготный генотип *TtAaBbFf* встречался в этих регионах с достаточно высокой частотой: от 5,3% в Восточном до 12,6% в Западном Полесье.

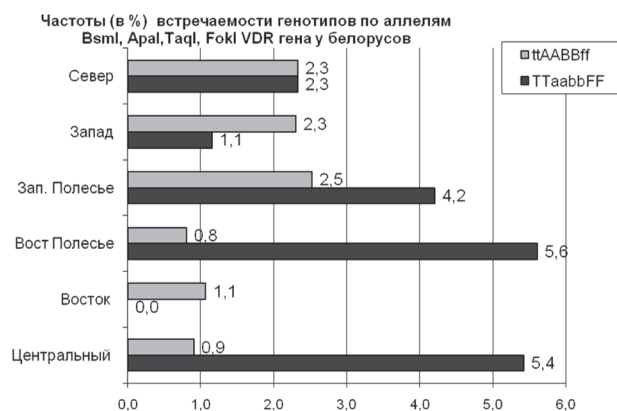


Рис. 3. Частоты встречаемости генотипов *ttAABBff* и *TTaabbFF* по аллелям *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*, *FokI* гена *VDR* у белорусов шести регионов, %

Генотип *ttAABBff* (табл. 5 и рис. 3) гена *VDR*, связанный с экспрессией менее активной формы рецептора витамина D [15], обнаружен у 0,9% обследованных людей Центрального и 1,1% Восточного регионов, а в Северном и Западном регионах – у 2,3%, тогда как противоположный генотип *TTaabbFF* отмечен у 5,4% белорусов Центрального региона и 5,6% Восточного Полесья и ни у одного из Восточного региона Поднепровья, а также всего у 1,1% людей Понеманья (Запад).

Достоверно отличались частоты генотипов представителей Центрального, Восточного и Северного регионов от всех остальных изученных популяций (табл. 5).

Заключение

Впервые изучена частота встречаемости полиморфных аллелей *ApaI* (A/a) (rs7975232), *TaqI* (T/t) (rs731236), *BsmI* (B/b) (rs1544410), *FokI* (F/f) (rs2228570) гена рецептора витамина D (*VDR*) в выборках этнических белорусов шести регионов Беларуси. Общие показатели частот генотипов по республике согласуются с аналогичными показателями для других европейских популяций. В основном, распределение частот генотипов и аллелей во всех регионах отличалось незначительно. Самая высокая (30,25%) частота *aa ApaI* (rs7975232) генотипа обнаружена в Центральном регионе. А частота рецессивного аллеля *b BsmI* (rs1544410) была статистически значимо выше в популяциях южной и западной части Беларуси (Восточное и Западное Полесье и Понёманье). Частоты генотипов и аллелей *TaqI* (T/t) (rs731236) и *FokI* (F/f) (rs2228570) гена рецептора витамина D (*VDR*) в изученных популяциях существенно не различались. Сама низкая частота (19,6%) *FF FokI* (rs2228570) генотипа выявлена в Западном регионе (Понёманье). При сопоставлении частот встречаемости сочетаний генотипов по всем полиморфным локусам было выявлено 54 сочетания генотипов из 61 возможного. Самым распространенным (с частотой 8,9%) был гетерозиготный генотип *TtAaBbFf*. Генотип *ttAABBff* гена *VDR*, связанный с экспрессией менее активной формы рецептора витамина D, обнаружен у 2,3% обследованных людей Северного и Западного регионов и у 0,9% Центрального и 1,1% Восточного регионов. Генотип *TTaabbFF*, по данным ряда исследований,

Таблица 5

Частоты наиболее частых (более 1%) сочетаний аллелей *BsmI* (B/b), *ApaI* (A/a), *TaqI* (T/t) и *FokI* (F/f) гена рецептора витамина D (*VDR*), %

Генотип	Центральный	Восточный **/bb	Вост.Полесье */aa/b	Зап.Полесье **/aa/bb	Запад **/aa/b	Северный **/a	Всего
TtAaBbFf	6,3	5,3	12,0	12,6	10,3	7,0	8,9
TTaabbFf	9,0	1,1	12,8	9,2	8,0	3,1	7,5
TtAaBbFF	6,3	6,4	6,4	7,6	4,6	8,5	6,7
TtAABbFf	9,9	6,4	4,0	6,7	8,0	3,9	6,6
TTAabbFf	1,8	3,2	3,2	8,4	16,1	5,4	5,9
ttAABBff	4,5	5,3	4,0	8,4	3,4	8,5	5,8
TtAaBbff	4,5	1,1	7,2	5,0	8,0	5,4	5,3
TtAABbFF	7,2	4,3	6,4	0,8	2,3	4,7	4,5
TTaBbFf	6,3	4,3	0,8	0,8	4,6	9,3	4,5
TTaabbff	3,6	7,4	1,6	6,7	4,6	0,0	3,8
TTaabbFF	5,4	0,0	5,6	4,2	1,1	2,3	3,4
ttAABBFF	1,8	4,3	3,2	1,7	2,3	5,4	3,1
TtAABbff	2,7	5,3	2,4	2,5	2,3	3,1	3,0
TTAaBbFf	0,0	4,3	2,4	3,4	2,3	6,2	3,0
TTAabbFF	0,9	1,1	4,0	4,2	4,6	0,8	2,5
TTaBbff	1,8	1,1	0,8	0,8	2,3	5,4	2,1
TTaabbff	1,8	2,1	3,2	1,7	2,3	0,8	2,0
TTAAbbFf	0,9	2,1	3,2	1,7	1,1	2,3	1,9
TTaBbFF	1,8	2,1	0,0	0,0	0,0	4,7	1,5
TtAABBff	0,9	4,3	0,8	0,8	2,3	0,8	1,5
TTAabbFF	0,0	4,3	2,4	0,8	0,0	1,6	1,4
ttAABBff	0,9	1,1	0,8	2,5	2,3	2,3	1,6

** – статистически значимые отличия от данных для Центра при $P < 0,01$; а – статистически значимые отличия от данных для Поднепровья (Восток) при $P < 0,05$; aa – статистически значимые отличия от данных для Поднепровья (Восток) при $P < 0,01$; b – статистически значимые отличия от данных для Подвинья (Север) при $P < 0,05$; bb – статистически значимые отличия от данных для Подвинья (Север) при $P < 0,01$

благоприятный для формирования костной ткани и поддержания плотности кости, был отмечен у 5,4% белорусов Центра и 5,6% Восточного Полесья и ни у одного человека из Восточного региона (Поднепровья), а также всего у 1,1% людей из выборки Западного региона (Понеманья). Полученные нами данные могут быть полезными как для развития предиктивной медицины, так и при решении задач лечения ряда заболеваний с использованием активной формы витамина D.

Список использованных источников

1. Norman, A.W. Vitamin D Receptor: New Assignments for an Already Busy Receptor / A.W. Norman // *Endocrinology*. – 2006. – Vol. 147, N 12. – P. 5542–5548.
2. Holick, M.F. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action/ M.F. Holick // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2008. – Vol. 29. – P. 361–368.
3. DeLuca, H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D / H.F. DeLuca // *Am.J.Clin.Nutr.* – 2004. – Vol. 80, 6 Suppl. – P. 1689S–1696S.
4. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed / M.R. Haussler [et al.] // *J Bone Miner Res.* – 1998. – Vol. 13, N 3. – P. 325–349.
5. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter / K. Miyamoto [et al.] // *Mol Endocrinol.* – 1997. – Vol. 11, N 8. – P. 1165–1179.

6. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel *N* terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts / L.A. Crofts [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1998. – Vol. 95. – P. 10 529–10 534.
7. Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets / M.R. Hughes [et al.] // *Science*. – 1988. – Vol. 242. – P. 1702–1705.
8. Zmuda, J.M., Molecular Epidemiology of vitamin D Receptor gene variants / J.M. Zmuda, J.A. Cauley, R.E. Ferrell // *Epidemiologic Reviews*. – 2000. – Vol. 22, N 2. – P. 203–217.
9. Evans, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily / R.M. Evans // *Science*. – 1988. – Vol. 240, Is. 4854. – P. 863–934.
10. An ochre mutation in the vitamin D receptor gene causes hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D₃-resistant rickets in three families / H.H. Ritchie [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1989. – Vol. 86, N 24. – P. 9783–9787.
11. The molecular basis of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D₃ resistant rickets in seven related families / P.J. Malloy [et al.] // *J Clin Invest*. – 1990. – Vol. 86, N 6. – P. 2071–2079.
12. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin D receptor gene predispose to osteoporotic fracture: The Rotterdam Study / Y. Fang [et al.] // *Am. J. Hum. Genet*. – 2005. – Vol. 77. – P. 807–823.
13. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles / N.A. Morrison [et al.] // *Nature*. – 1994. – Vol. 367. – P. 284–287.
14. Dawson-Hughes, B. Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype / B. Dawson-Hughes, S.S. Harris, S. Finneran // *J Clin Endocrinol Metab*. – 1995. – Vol. 80, N 12. – P. 3657–3661.
15. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms / A.G. Uitterlinden [et al.] // *Gene*. – 2004. – Vol. 338. – P. 143–156.
16. SNP linked to Gene (gene ID:7421) Via Contig Annotation [Electronic resource] / National Center for Biotechnology Information (NCBI). – Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?showRare=on&choosers=all&go=Go&locusId=7421.
17. Deeb, K.K. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics / K.K. Deeb, D.L. Trump, C.S. Johnson // *Nature Reviews Cancer*. – 2007. – Vol. 7. – P. 684–700.
18. Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus / B. Gyorffy [et al.] // *European Journal of Endocrinology*. – 2002. – Vol. 147. – P. 803–808.
19. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans / M.A. Pani [et al.] // *Diabetes*. – 2000. – Vol. 49, N 3. – P. 504–507.
20. Association study of VDR gene with rheumatoid arthritis in the French population / A. Maalej [et al.] // *Genes Immun*. – 2005. – Vol. 6, N 8. – P. 707–711.
21. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus / O.A. Monticeli [et al.] // *Lupus*. – 2012. – Vol. 21, N 1. – P. 43–52.
22. Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility / J.D. Simmons [et al.] // *Gut*. – 2000. – Vol. 47, N 2. – P. 211–214.
23. 5' regulatory and 3' untranslated region polymorphisms of vitamin D receptor gene in south Indian HIV and HIV-TB patients / K. Alagarasu [et al.] // *J Clin Immunol*. – 2009. – Vol. 29, N 2. – P. 196–204.
24. Prediction of bone mineral density from vitamin D receptor polymorphisms is uncertain in representative samples of Japanese Women. The Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) / A. Morita [et al.] // *International Journal of Epidemiology*. – 2004. – Vol. 33. – P. 979–988.
25. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility of hand osteoarthritis in Finnish women / S. Solovieva [et al.] // *Arthritis Res Ther*. – 2006. – Vol. 8, N 1. – R20.
26. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and relative hypoparathyroidism in patients with chronic renal failure / E. Fernández [et al.] // *J Am Soc Nephrol*. – 1997. – Vol. 8, N 10. – P. 1546–1552.
27. Iron indices and vitamin D receptor polymorphisms in hemodialysis patients / M. Amato [et al.] // *Adv Chronic Kidney Dis*. – 2008. – Vol. 15, N 2. – P. 186–190.
28. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease

- // D. Gezen-Ak [et al.] // *Tohoku J Exp Med.* – 2007. – Vol. 212, N 3. – P. 275–282.
29. Vitamin D receptor gene as a candidate gene for Parkinson disease / M.W. Butler [et al.] // *Ann Hum Genet.* – 2011. – Vol. 75, N 2. – P. 201–210.
30. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with sporadic breast cancer in Taiwanese patients / M.F. Hou [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* – 2002. – Vol. 74, N 1. – P. 1–7.
31. An enhanced risk of basal cell carcinoma is associated with particular polymorphisms in the *VDR* and *MTHFR* genes / A. Lesiak [et al.] // *Exp Dermatol.* – 2011. – Vol. 20, N 10. – P. 800–804.
32. Association between vitamin D receptor gene haplotypes and chronic periodontitis among Japanese men / M. Naito [et al.] // *International Journal of Medical Sciences.* – 2007. – Vol. 4, N 4. – P. 216–222.
33. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий // Минск: Высшая школа, 1964. – С. 273 (20).
34. Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population / H. Turpeinen [et al.] // *Eur J Endocrinol.* – 2003. – Vol. 149, N 6. – P. 591–596.
35. A rare haplotype of the vitamin D receptor gene is protective against diabetic nephropathy / R.J. Martin, [et al.] // *Nephrol Dial Transplant.* – 2010. – Vol. 25, N 2. – P. 497–503.
36. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women / P. Garnero [et al.] // *J Bone Miner Res.* – 1995. – Vol. 10, N 9. – P. 1283–1288.
37. FokI polymorphism of the vitamin D receptor gene correlates with parameters of bone mass and turnover in a female population of the Italian island of Lampedusa / A. Falchetti [et al.] // *Calcif Tissue Int.* – 2007. – Vol. 80, N 1. – P. 15–20.
38. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density / L. Gennari [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1998. – Vol. 83, N 3. – P. 939–944.
39. Vitamin D receptor gene polymorphisms in a group of postmenopausal Turkish women: association with bone mineral density / T. Yoldemir [et al.] // *Climacteric.* – 2011. – Vol. 14, N 3. – P. 384–391.
40. Vidal, M. Stat1-vitamin D receptor interactions antagonize 1,25-dihydroxyvitamin D transcriptional activity and enhance stat1-mediated transcription / M. Vidal, C.V. Ramana, A.S. Dusso // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 22. – P. 2777–2787.
41. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with type 1 diabetes mellitus in two Spanish populations. (In Spanish) / G. Martí [et al.] // *Med Clin (Barc).* – 2004. – Vol. 123. – P. 286–290.
42. Analysis of polymorphisms of the vitamin D receptor, estrogen receptor, and collagen I alpha1 genes and their relationship with height in children with bone cancer / E. Ruza [et al.] // *J Pediatr Hematol Oncol.* – 2003. – Vol. 25. – P. 780–786.
43. Влияние аллельных вариантов гена *VDR3* на скорость потери минеральной плотности костной ткани у женщин в ранней постменопаузе / И.Е. Зазерская [и др.] // *Журнал акушерства и женских болезней.* – 2005. – № 2. – С. 23–30.
44. Москаленко, М.В. Полиморфизм ряда генов метаболизма костной ткани и остеопороз у человека: автореф. дисс. канд. мед. наук: 03.02.07 / М.В. Москаленко, СПбГУ. – СПб., 2011. – 19 с.
45. Семейный анализ ассоциации полиморфизма генов *SLC11A1*, *VDR*, *IL12B*, *IL1B*, *IL1RA* с туберкулезом у тувинцев и русских / М.Б. Фрейдин [и др.] // *Медицинская генетика.* – 2006. – № 10. – С. 13–16.
46. Исследование полиморфизмов SpI (1546GT) гена коллагена I и FokI (3663TC) гена рецептора витамина у больных синдромами / А.С. Абулгатина [и др.] // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* – 2007. – Т. 107, № 9. – С. 60–66.
47. Effect of age, gender and calciotropic hormones on the relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density / A. Arabi [et al.] // *Eur J Clin Nutr.* – 2010. – Vol. 64, N 4. – P. 383–391.
48. Vitamin D receptor genotypes are associated with bone mass in patients with Turner syndrome / M. Peralta López [et al.] // *J Pediatr Endocrinol Metab.* – 2011. – Vol. 24, N 5–6. – P. 307–312.
49. The genetic association of vitamin D receptor polymorphisms and cervical spondylotic

myelopathy in Chinese subjects / Z.C. Wang [et al.] // Clin Chim Acta. – 2010. – Vol. 411, N 11–12. – P. 794–797.

50. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in 0-6-year-old Han children / X.D. Yu [et al.] // J Bone Miner Metab. – 2011. – Vol. 29, N 1. – P. 54–61.

51. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the Chinese Han population: a case-control study / A. Saadi [et al.] // BMC Med Genet. – 2009. – Vol. 10. – P. 71. – doi: 10.1186/1471-2350-10-71.

52. Vitamin D receptor polymorphism among rickets children in Mongolia / A. Kaneko [et al.] // J Epidemiol. – 2007. – Vol. 17, N 1. – P. 25–29.

53. Vitamin D receptor polymorphisms and nutritional rickets in Nigerian children / P.R. Fischer [et al.] // J Bone Miner Res. – 2000. – Vol. 15, N 11. – P. 2206–2210.

54. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women / H. Arai [et al.] // J Bone Miner Res. – 1997. – Vol. 12, N 6. – P. 915–921.

55. Vitamin D receptor gene FokI polymorphism predicts calcium absorption and bone mineral density in children / S.K. Ames [et al.] // Bone Miner Res. – 1999. – Vol. 14, N 5. – P. 740–746.

56. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density / P. Garnero [et al.] // J. Clin Endocrinol Metab. – 2005. – Vol. 90, N 8. – P. 4829–4835.

57. [Bone density and bone metabolism regulated by vitamin D receptor allele polymorphism in a German study sample]. [Article in German] / A.W. Baltzer [et al.] // Z Orthop Ihre Grenzgeb. – 1999. – Vol. 137, N 3. – P. 273–279.

E.A. Aksyonova, A.P. Silvanovich, A.V. Mihailovskaya, H.G. Danilenko

PECULIARITIES OF *VDR* GENE POLYMORPHIC ALLELE FREQUENCIES IN POPULATIONS OF NATIVE BELARUSIANS

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

The genotype and allele frequencies of vitamin D receptor (*VDR*) gene, namely *FokI* (rs2228570), *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232) and *TaqI* (rs731236) polymorphisms have been studied in population of 762 native Belarusians from 6 ethnogeographic regions. The following general genotype frequencies were observed: 46.3% (TT); 41.1% (Tt); 12.6% (tt) for rs731236; 34.8% (AA); 41.5% (Aa); 23.7% (aa) for rs7975232; 17.9% (BB); 50.7% (Bb); 31.4% (bb) for rs1544410; 29.1% (FF); 50.3% (Ff); 20.6% (ff) for rs2228570. The heterozygous genotype (TtAaBbFf) was the most frequent in Belarus population (8.9%). The ttAABBff *VDR* genotype was found in 1.6% of native Belarusians and the TTaabbFF genotype in 3.4% of the populations. The significant differences between *VDR* genotype frequencies in populations of 6 ethnogeographic regions were found.

Key words: vitamin D receptor, *VDR* polymorphism, population allele frequencies in Belarusians

Дата поступления статьи 3 октября 2016 г.

П.М. Морозик, М.Д. Амелянович, К.В. Жур, Е.В. Нестеренко, П.В. Евлеев, И.Б. Моссэ

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К КОСТНЫМ ПЕРЕЛОМАМ У СПОРТСМЕНОВ

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

В работе проведен анализ частот встречаемости полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме костной ткани, и изучена их ассоциация с частотой стресс-переломов у спортсменов. Выявлены полиморфные варианты генов и их аллельные комбинации, оказывающие наибольший вклад в предрасположенность к костным переломам. Для носителей аллельной комбинации *A-B-t-T-A* по полиморфизмам rs7975232, rs1544410, rs731236, rs1800012 и rs42517 соответственно, риск стресс-переломов существенно повышен ($OR = 17,6$, [95% CI 1,4–230,1], $P = 0,029$). Результаты исследования свидетельствуют о важной роли полиморфизма генов *VDR*, *COL1A1* и *COL1A2* в этиологии стресс-переломов.

Ключевые слова: стресс-переломы, генетическая предрасположенность, спортсмены, полиморфизм, *VDR*

Введение

Характерные для спортсменов постоянные длительные физические и психологические нагрузки могут приводить к травмам и различным патологическим состояниям. До 20% от общего числа всех травм атлетов составляют стресс-переломы [1]. Основной причиной таких переломов является длительная повторяющаяся физическая нагрузка на скелет, в результате чего происходит нарушение микроархитектуры костей, снижение их прочности [2]. Патофизиологические механизмы стресс-переломов существенно отличаются от остеопоротических или травматических переломов [2].

Патогенез стресс-переломов является комплексным и включает генетические и негенетические (средовые) факторы [3]. Риск костных переломов во многом обусловлен особенностями метаболизма костной ткани, который контролируется рядом генов и в значительной степени варьирует при систематических физических нагрузках, приводящих к дезинтеграции структуры костной ткани [4]. В связи с этим, актуальным вопросом является определение генетических маркеров предрасположенности к костным переломам у спортсменов. В мире было проведено множество исследований по идентификации специфических генных маркеров, ассоциированных с ломкостью костей, на пациентах с остеопоротическими переломами [5–7] и на военнослужащих со стресс-переломами

[8–9]. В единственном исследовании на спортсменах была показана ассоциация полиморфизмов *RANK* rs3018362 и *RANKL* rs1021188 с риском стресс-переломов [10]. В исследованиях на военнослужащих была показана ассоциация риска возникновения костных переломов с полиморфизмом генов рецептора витамина D [8], андрогена [11] и эстрогена [12].

Стоит отметить, что в отличие от общей популяции, спортсмены постоянно подвергаются повышенным физическим нагрузкам и стрессу, что является провоцирующим фактором для проявления генетической предрасположенности к костным переломам. По этой причине некоторые варианты генов, которые не оказывают эффекта в общей популяции, могут существенно повысить риск костных переломов среди спортсменов, и наоборот.

Цель работы – анализ полиморфизма генов, участвующих в метаболизме костной ткани, и выявление аллельных комбинаций, определяющих предрасположенность к стресс-переломам у спортсменов.

В качестве тестируемых генетических маркеров были выбраны на основании литературных данных специфические однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) генов, участвующих в метаболизме костной ткани. Ген рецептора витамина D (*VDR*) опосредует биологический эффект витамина D, регулирующего костную резорбцию, минерализацию костного матрикса

са и метаболизм кальция [13]. Гены *COL1A1* и *COL1A2* кодируют компоненты белка коллагена 1-го типа, обеспечивающего прочность и эластичность соединительной ткани [14–15]. Полиморфный вариант гена *LCT* ассоциирован с активностью фермента лактазы, лактозной непереносимостью и влияет на уровень всасывания кальция.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие профессиональные спортсмены – представители художественной гимнастики (34 человека), пожарно-спасательного спорта (46 человек) и стрельбы из лука (11 человек) – всего 91 человек. Сбор образцов для исследования и получение информированного согласия осуществлялись сотрудниками Республиканского научно-практического центра спорта Министерства спорта и туризма Республики Беларусь (г. Минск). Отбор участников исследования, анкетирование, сбор информации из медицинских карт, генотипирование образцов ДНК и обработка результатов проводились сотрудниками лаборатории генетики человека Института генетики и цитологии НАН Беларуси. По результатам анкетирования и изучения анамнеза все участники исследования были разделены на 2 группы: спортсмены со стресс-переломами (ССП, 33 человека) и спортсмены без костных переломов в анамнезе (СБП, 58 человек).

В качестве биологического материала использовали ДНК, выделенную из Buccalного эпителия с помощью коммерческих наборов Нуклеосорб-А (ОДО «Праймтех», Беларусь) согласно инструкции производителя.

Генетическое тестирование полиморфных вариантов *VDR ApaI* (rs7975232), *VDR BsmI* (rs1544410), *VDR TaqI* (rs731236), *VDR Cdx2* (rs11568820), *COL1A1 Sp1* (rs1800012), *COL1A2 A18162G* (rs42517) и *LCT T-13910C* (rs4988235) осуществляли с использованием коммерческих наборов праймеров и зондов TaqMan® компании Applied Biosystems (США) в соответствии с инструкцией производителя. Детекцию флуоресценции, а также первичную обработку результатов осуществляли программным обеспечением CFX Manager 3.1 прибора CFX96, BIO-RAD (США). Во время каждой постановки ПЦР применялся положительный и отрицательный контроль.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы R (<http://www.r-project.org/>) для Windows с помощью дополнительных пакетов для анализа генетических данных SNPAssoc (версия 1.9-2) и Haplo.stats (версия 1.7.7).

Наблюдаемые частоты генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью критерия χ^2 Пирсона. Для оценки ассоциации между патологией и исследуемыми вариантами генов применяли коэффициент отношения шансов (*OR*) с 95%-ным доверительным интервалом, показывающий, во сколько раз выше вероятность патологии при наличии определенного генотипа.

Для оценки различий между количественными и качественными показателями исследуемых групп использовали линейную и логистическую регрессии соответственно. Оценку вероятности проводили с помощью точного теста Фишера. Логистическая регрессия также применялась для сравнения частот аллелей, генотипов и гаплотипов между исследуемыми группами.

Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования представителей различных видов спорта разделили на подгруппы в зависимости от наличия костных переломов в анамнезе: группа лиц без костных переломов и группа лиц со стресс-переломами в анамнезе (табл. 1).

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о том, что исследуемые группы не отличаются по возрасту, весу, росту, индексу массы тела и полу (разница статистически не значима во всех случаях).

Частоты аллелей и генотипов

В табл. 2 приведены результаты генотипирования исследуемых групп спортсменов со стресс-переломами и без переломов по семи маркерам ломкости костей. Выбор SNP осуществлялся на основании литературных данных и собственных исследований, в которых была показана ассоциация исследуемых полиморфизмов с уровнем минеральной плотности костей у пациентов с остеопорозом [16]. Распределение частот генотипов по всем анализируемым полиморфизмам в исследуемых группах не отличалось от ожидаемого распределения Харди-Вайнберга ($P > 0,05$).

Таблица 1

Характеристика исследуемых групп спортсменов со стресс-переломами (ССП) и без переломов (СБП)

Показатель	СБП	ССП	P
N	58	33	
Возраст, лет*	18,5 (15,0; 25,0)	18,0 (16,5; 22,0)	0,87
Вес, кг*	64,7 (49,2; 79,2)	52,0 (50,5; 76,5)	0,32
Рост, см*	172,8 (164,7; 184,0)	172,0 (165,0; 179,5)	0,54
ИМТ**, кг/см ² *	22,2 (18,9; 23,2)	19,0 (17,0; 23,6)	0,40
Пол, % мужск.	53,5	36,4	0,12

* – данные представлены в виде медианы и 25%, 75% квартилей;

** – ИМТ – индекс массы тела

Таблица 2

Частоты генотипов и минорных аллелей в группе спортсменов со стресс-переломами и без переломов в анамнезе

Ген, SNP	Генотип, аллель	СБП, % (n = 58)	ССП, % (n = 33)	OR (CI 95%)	P
<i>VDR ApaI</i> rs7975232	a/a	34,5	15,2	1,0	0,03
	a/A	48,3	45,5	2,1 (0,7–6,9)	
	A/A	17,2	39,4	5,2 (1,4–18,7)	
	A аллель	41,4	62,1	2,3 (1,3–4,3)	0,007
<i>VDR BsmI</i> rs1544410	b/b	34,5	21,2	1,0	0,049
	b/B	55,2	48,5	1,4 (0,5–4,1)	
	B/B	10,3	30,3	4,8 (1,3–18,0)	
	B аллель	37,9	54,5	2,0 (1,1–3,6)	0,03
<i>VDR TaqI</i> rs731236	T/T	34,5	27,3	1,0	0,09
	T/t	51,7	39,4	0,96 (0,4–2,7)	
	t/t	13,8	33,3	3,1 (1,1–8,8)	
	t аллель	39,7	53,0	1,7 (0,9–3,2)	0,08
<i>VDR Cdx2</i> rs11568820	G/G	72,0	75,0	1,0	0,96
	G/A	24,0	21,4	0,9 (0,3–2,6)	
	A/A	4,0	3,6	0,9 (0,1–10,0)	
	A аллель	16,0	14,3	0,9 (0,4–2,2)	0,78
<i>COL1A1 Sp1</i> rs1800012	G/G	72,4	60,6	1,0	0,5
	G/T	22,4	33,3	1,8 (0,7–4,7)	
	T/T	5,2	6,1	1,4 (0,2–9,1)	
	T аллель	16,4	22,7	1,5 (0,7–3,2)	0,3
<i>COL1A2 A18162G</i> rs42517	A/A	63,8	51,2	1,0	0,08
	A/G	36,2	36,4	1,2 (0,5–3,1)	
	G/G	0	12,1	–	
	G аллель	18,1	30,3	2,0 (0,97–4,0)	0,06

Продолжение табл. 2

Ген, SNP	Генотип, аллель	СБП, % (n = 58)	ССП, % (n = 33)	OR (CI 95%)	<i>P</i>
<i>LCT</i> <i>T-13910C</i> rs4988235	C/C	52,7	39,4	1,0	0,34
	C/T	40	45,5	1,5 (0,6–3,8)	
	T/T	7,3	15,2	2,8 (0,6–12,1)	
	<i>T</i> аллель	27,3	37,9	1,63 (0,9–3,1)	0,14

Примечание. Статистически значимые значения *P* выделены жирным шрифтом ($P < 0,05$). OR – отношение шансов; CI – доверительный интервал

Полученные результаты генотипирования свидетельствуют о том, что статистически значимые различия между исследуемыми группами наблюдаются для полиморфных вариантов rs7975232 и rs1544410 гена *VDR*.

Наиболее существенные различия между исследуемыми группами в распределении частот генотипов и аллелей выявлены для полиморфизма rs7975232 гена *VDR*. Для лиц, гомозиготных по аллелю *A* (генотип *A/A*), риск костных переломов значительно повышен по сравнению с носителями гомозиготного генотипа *a/a* ($OR = 5,2$ [95% CI: 1,4–18,7], $P = 0,03$), что свидетельствует о значительном вкладе аллеля *A* в предрасположенность к ломкости костей. Кроме того, показано, что среди лиц группы ССП, частота аллеля *A* выше по сравнению с группой СБП, $OR = 2,3$ [95% CI: 1,3–4,3], $P = 0,007$.

Статистически значимые различия между исследуемыми группами спортсменов также выявлены при анализе распределения частот генотипов и аллелей полиморфизма rs1544410 гена *VDR*. Среди носителей неблагоприятного генотипа *B/B* риск костных переломов существенно повышен ($OR = 4,8$ [95% CI: 1,3–18,0], $P = 0,049$). При анализе распределения аллелей по полиморфному варианту rs1544410 гена *VDR* также обнаружены различия между анализируемыми группами ($P = 0,03$, табл. 2). Среди носителей благоприятного аллеля *b* риск костных переломов снижен, $OR = 0,51$ [95% CI: 0,3–0,9], $P = 0,03$ (данные не представлены).

Анализ распределения частот генотипов по полиморфизму rs731236 гена *VDR* среди исследуемых групп не выявил статистически значимой их ассоциации с риском стресс-переломов, выявлена лишь тенденция к уве-

личению риска костных переломов для носителей генотипа *t/t* ($OR = 3,1$ [95% CI: 1,1–8,8], $P = 0,09$). На уровне тенденции также выявлена связь аллеля *G* полиморфизма rs42517 гена *COL1A2* с увеличением риска переломов ($OR = 2,0$, [95% CI: 1,0–4,0], $P = 0,06$). Примечательно, что в группе СБП не было обнаружено ни одного обладателя гомозиготного генотипа *G/G*, в то время как среди лиц со стресс-переломами было выявлено 4 носителя этого генотипа.

Согласно представленным в табл. 2 данным, между группами СБП и ССП не найдено статистически значимых различий в распределении генотипов по полиморфным вариантам rs11568820 гена *VDR*, rs1800012 гена *COL1A1* и rs4988235 гена *LCT*. Тем не менее, стоит отметить, что частота генотипа *T/T* полиморфизма rs1800012 гена *COL1A1* в группе спортсменов со стресс-переломами выше по сравнению с контрольной группой, а отсутствие статистической значимости может быть обусловлено недостаточным числом лиц в каждой группе обследуемых. Учитывая, что продукт этого гена является одним из основных компонентов костной ткани, его дальнейшие исследования представляют несомненный интерес.

Полиморфизм rs4988235 гена лактазы хорошо изучен: аллель *C* обуславливает непереносимость лактозы вследствие отсутствия фермента кишечной лактазы и неспособности лактозы расщепляться до глюкозы и галактозы. В результате человек с лактозной непереносимостью избегает употребления молочных продуктов, и вследствие этого снижается поступление кальция в организм. Показано, что генотип *C/C* полиморфизма rs4988235 у пациентов с остеопорозом ассоциирован с костными пере-

ломами [17]. Возможной причиной отсутствия статистически значимой ассоциации этого полиморфизма с частотой стресс-переломов в настоящем исследовании может являться тот факт, что чаще всего лактозная непереносимость проявляется после 35 лет, в то время как средний возраст принявших участие в исследовании спортсменов – около 18 лет (табл. 1).

Таким образом, на основании проведенного исследования были определены два полиморфных варианта – rs7975232 и rs1544410, которые статистически значимо ассоциированы с предрасположенностью к стресс-переломам у спортсменов, и три потенциально ассоциированных полиморфных варианта – rs731236, rs1800012 и rs42517.

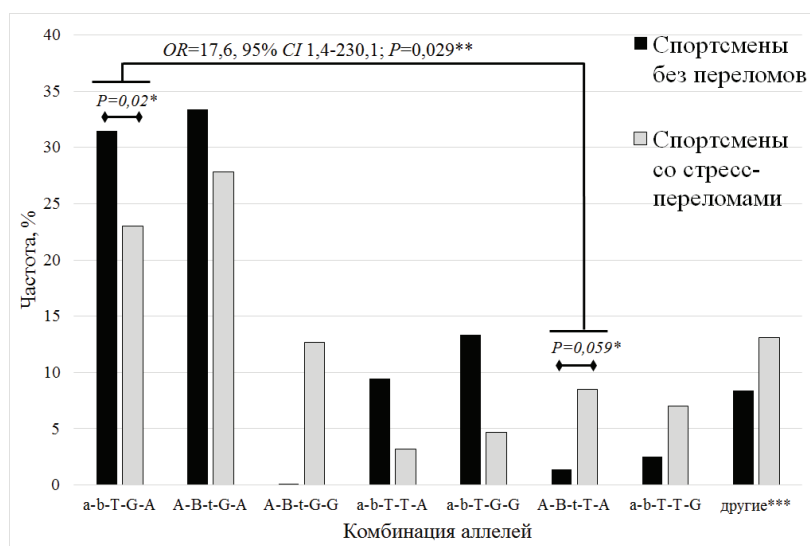
Анализ комбинаций аллелей

Из дальнейшего исследования полиморфные варианты rs4988235 и rs11568820 были исключены в связи с их неинформативностью; анализ частот встречаемости комбинаций аллелей проводили по пяти маркерам. По результатам генотипирования по полиморфным вариантам rs7975232, rs1544410, rs731236 гена *VDR*, rs1800012 гена *COL1A1* и rs42517 гена *COL1A2* было выявлено семь вариантов аллельных комбинаций, суммарная частота которых в группах СБП и ССП превышала 3% (рис. 1, всего выявлено 17 вариантов комбинаций).

С помощью метода логистической регрессии проанализировали общее распределение частот для всех выявленных аллельных комбинаций по пяти полиморфным вариантам между исследуемыми группами СБП и ССП. В результате были выявлены статистически значимые различия в глобальном распределении аллельных комбинаций между исследуемыми группами ($\chi^2 = 14,5$, $df = 7$, общее $P = 0,04$), что свидетельствует об ассоциации частоты стресс-переломов с проанализированными SNP.

Наиболее распространенной в исследуемой группе спортсменов является комбинация аллелей дикого типа *a-b-T-G-A* (общая частота – 31,2%), причем ее частота в группе СБП статистически значимо выше по сравнению с группой лиц с переломами (частоты 31,5 и 23,0%, соответственно, $P = 0,02$).

Расчет *OR* относительно референсной (наиболее распространенной) аллельной комбинации *a-b-T-G-A* в группах СБП и ССП позволил выявить комбинацию аллелей *A-B-t-T-A*, среди носителей которой риск костных переломов существенно повышен ($OR = 17,6$, [95% *CI* 1,4–230,1], $P = 0,029$). Одновременно выявлена тенденция преобладания частоты встречаемости этой комбинации в группе лиц с костными переломами (8,5%) по сравнению с группой СБП (1,4%, $P = 0,059$).



* – сравнение между группами СБП и ССП; ** – сравнение между частотами *a-b-T-G-A* и *A-B-t-T-A* в группах СБП и ССП; *** – все аллельные комбинации с общей частотой менее 3%.

Рис. 1. Частоты распределения комбинаций аллелей полиморфизмов генов *VDR* rs7975232, rs1544410, rs731236, *COL1A1* rs1800012 и *COL1A2* rs42517 в контрольной группе (СБП) и группе лиц со стресс-переломами (ССП)

Стоит отметить, что в состав аллельной комбинации *A-B-t-T-A* входят неблагоприятные варианты 4 из 5 анализируемых маркеров (rs7975232, rs1544410, rs731236, rs1800012). Общая частота комбинации *A-B-t-T-G*, содержащей все 5 неблагоприятных вариантов аллелей, составила менее 3%, что не позволило оценить ее вклад в риск развития костных переломов на исследуемой выборке. Тем не менее, стоит отметить, что в группе лиц со стресс-переломами количество человек с такой комбинацией аллелей почти в 2 раза больше по сравнению с контролем.

При анализе частот распределения оставшихся аллельных комбинаций статистически значимых различий между исследуемыми группами СБП и ССП не выявлено.

Анализ неравновесного сцепления

Индивидуальный и комплексный анализ ассоциации генетических маркеров с частотой костных переломов в группе спортсменов по-

	rs1544410	rs731236	rs11568820	rs1800012	rs42517
rs7975232	$D' = 0,9476$; $r = 0,8579$; $P = 2,22 \times 10^{-16}$	$D' = 0,9489$; $r = 0,8686$; $P = 2,22 \times 10^{-16}$	$D' = 0,1162$; $r = -0,0485$; $P = 0,5449$	$D' = 0,1892$; $r = -0,0887$; $P = 0,2315$	$D' = 0,0056$; $r = -0,00297$; $P = 0,9679$
rs1544410		$D' = 0,9542$; $r = 0,9436$; $P = 2,22 \times 10^{-16}$	$D' = 0,0113$; $r = 0,0055$; $P = 0,9457$	$D' = 0,2761$; $r = -0,1172$; $P = 0,1139$	$D' = 0,0028$; $r = -0,0014$; $P = 0,9854$
rs731236			$D' = 0,0196$; $r = -0,0075$; $P = 0,9256$	$D' = 0,2235$; $r = -0,0959$; $P = 0,1956$	$D' = 0,0113$; $r = -0,0133$; $P = 0,8572$
rs11568820				$D' = 0,1335$; $r = 0,1188$; $P = 0,1379$	$D' = 0,2045$; $r = 0,1617$; $P = 0,04$
rs1800012					$D' = 0,0825$; $r = 0,0734$; $P = 0,3224$

Значения показателя неравновесности D' , коэффициента корреляции r и значение P между парами анализируемых маркеров указаны в соответствующих ячейках. Коэффициент D' изменяется от 0 (равновесное сцепление) до 1 (высокая степень неравновесности сцепления). Положительная корреляция (r) свидетельствует об ассоциации мажорных аллелей друг с другом, отрицательная корреляция означает ассоциацию мажорного аллеля одного SNP с минорным аллелем другого SNP, и наоборот.

Рис. 2. Карта неравновесного сцепления полиморфизмов rs7975232, rs1544410, rs731236, rs11568820, rs1800012 и rs42517 по результатам генетического тестирования группы спортсменов

зволил выявить пять полиморфных вариантов генов, ассоциированных с ломкостью костей, которые вносят наибольший вклад в предрасположенность к стресс-переломам. Большой интерес представляет анализ неравновесного сцепления (*Linkage Disequilibrium, LD*) полиморфизма проанализированных генов. Выявление статистически значимого высокого коэффициента неравновесности позволит определить аллели, которые преимущественно наследуются сцепленно. Результаты анализа *LD* представлены на рис. 2.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, три полиморфных варианта (rs7975232, rs1544410 и rs731236) обладают высоким коэффициентом неравновесного сцепления. Наследование аллеля rs7975232 *a* в высокой степени коррелирует с наличием аллелей rs1544410 *b* и rs731236 *T* ($D' = 0,95$; $r = 0,86$ и $D' = 0,95$; $r = 0,87$, соответственно, $P < 0,01$ в обоих случаях). Аналогичная связь наблюдается между аллелями rs1544410 *b* и rs731236 *T* ($D' = 0,95$; $r = 0,94$, $P < 0,01$). По всей видимости, высокий коэффициент неравновесности обусловлен локализацией всех трех SNP в 9 экзоне гена *VDR* на длинном плече 12 хромосомы.

Выявленные полиморфизмы с высоким коэффициентом неравновесности с высокой вероятностью формируют гаплотипы *a-b-T* и *A-B-t*, которые наследуются сцепленно. Анализ частот гаплотипов по этим трем полиморфным вариантам в группах СБП и ССП позволил выявить высокую ассоциацию неблагоприятного гаплотипа *A-B-t* с риском стресс-переломов костей (референсный гаплотип: *a-b-T*, $OR = 2,5$, [95% CI 1,2–5,0], $P = 0,016$). Такое неравновесное распределение частот аллелей разных полиморфных вариантов гена *VDR* может быть обусловлено не только их тесным генетическим сцеплением (все они локализованы в 9 экзоне гена), но и адаптивным преимуществом конкретной аллельной комбинации. Выявление неблагоприятных гаплотипов позволит более точно оценивать индивидуальный риск костных переломов.

Статистически значимой корреляции между другими SNP в ходе анализа неравновесного сцепления генов выявлено не было (рис. 2).

Заключение

Основным результатом, полученным в ходе проведенного исследования, является выявление аллельных комбинаций и гаплотипов, которые статистически значимо повышают риск стресс-переломов в исследованной группе спортсменов. Наибольшей информативностью обладают полиморфные варианты rs7975232, rs1544410 и rs731236 гена *VDR*, имеющие высокий коэффициент неравновесного сцепления.

Выявление неблагоприятных вариантов аллельных комбинаций позволит проводить оценку индивидуального риска костных переломов. Результаты исследования переданы врачам и тренерам команд для профилактики травм, связанных с экстремальными физическими нагрузками, путем оптимизации и коррекции тренировочного процесса и медико-биологического обеспечения.

Авторы искренне благодарят сотрудников Республиканского научно-практического центра спорта Министерства спорта и туризма Республики Беларусь, Центра организации спортивно-массовой работы Государственного пожарного аварийно-спасательного учреждения «Республиканский отряд специального назначения» Министерства по чрезвычайным ситуациям Республики Беларусь и Республиканского центра олимпийской подготовки по гимнастике художественной за предоставление образцов биологического материала спортсменов.

Список использованных источников

1. Stress fractures in athletes / M. Fredericson [et al.] // *Top Magn. Reson. Imaging*. – 2006. – Vol. 17, N 5. – P. 309–325.
2. Warden, S.J. Stress fractures: pathophysiology, epidemiology, and risk factors / S.J. Warden, D.B. Burr, P.D. Brukner // *Curr. Osteoporos. Rep.* – 2006. – Vol. 4. – P. 103–109.
3. Risk factors for stress fractures / K. Bennell [et al.] // *Sports Med.* – 1999. – Vol. 28. – P. 91–122.
4. Gene-based association analysis identified novel genes associated with bone mineral density / X.-B. Mo [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, N 3. – e0121811.
5. Urano, T. Recent genetic discoveries in osteoporosis, sarcopenia and obesity / T. Urano, S. Inoue // *Endocr. J.* – 2015. – Vol. 62, N 6. – P. 475–484.
6. Clark, G.R. The genetics of osteoporosis / G.R. Clark, E.L. Duncan // *Br. Med. Bull.* – Vol. 113, N 1. – P. 73–81.
7. Rivadeneira, F. Osteoporosis and bone mass disorders: from gene pathways to treatments / F. Rivadeneira, O. Mäkitie // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2016. – Vol. 27, N 5. – P. 262–281.
8. Genetic predisposition for femoral neck stress fractures in military conscripts / J. Korvala [et al.] // *BMC Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P. 95.
9. Determinants of stress fracture risk in United States Military Academy cadets / F. Cosman [et al.] // *Bone*. – 2013. – Vol. 55. – P. 359–366.
10. RANK/RANKL/OPG pathway: genetic associations with stress fracture period prevalence in elite athletes / I. Varley [et al.] // *Bone*. – 2014. – Vol. 71C. – P. 131–136.
11. Androgen receptor CAG repeat size is associated with stress fracture risk: a pilot study / R. Yanovich [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2011. – Vol. 469. – P. 2925–2931.
12. Risk factors for clinical stress fractures in male military recruits: a prospective cohort study / V.V. Valimaki [et al.] // *Bone*. – 2005. – Vol. 37. – P. 267–273.
13. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms / A.G. Uitterlinden [et al.] // *Gene*. – 2004. – Vol. 338, N 2. – P. 143–156.
14. Combined effects of collagen type I alpha1 (*COL1A1*) *Sp1* polymorphism and osteoporosis risk factors on bone mineral density in Turkish postmenopausal women / O. Kurt-Sirin [et al.] // *Gene*. – 2014. – Vol. 540, N 2. – P. 226–231.
15. Two rare mutations in the *COL1A2* gene associate with low bone mineral density and fractures in Iceland / U. Styrkarsdottir [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2016. – Vol. 31, N1. – P. 173–179.
16. Association between polymorphisms of *VDR*, *COL1A1*, and *LCT* genes and bone mineral density in Belarusian women with severe postmenopausal osteoporosis / P. Marozik [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. – Vol. 49, N 4. – P. 177–184.
17. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures / B.M. Obermayer-Pietsch [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2004. – Vol. 19, N 1. – P. 42–47.

P.M. Marozik, M.D. Ameliyanovich, K.V. Zhur, K.V. Nestsarenka, P.V. Yeuleyev, I.B. Mosse

ANALYSIS OF GENETIC PREDISPOSITION TO ATHLETES' BONE FRACTURES

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

The analysis of genetic polymorphism, involved in bone metabolism, and their association with stress-fractures in athletes has been performed. We have identified the major stress fracture susceptibility gene polymorphisms and their allelic combinations. For the carriers of rs7975232, rs1544410, rs731236, rs1800012 and rs42517 *A-B-t-T-A* allelic combination, the risk of stress fractures was statistically significantly increased ($OR = 17$, [95% *CI* 1,4–230,1], $P = 0,029$). Our findings suggest that *VDR*, *COL1A1* and *COL1A2* genes play a role in the development of stress-fractures.

Key words: stress fractures, genetic predisposition, athletes, polymorphism, *VDR*

Дата поступления статьи 7 октября 2016 г.

А.С. Кондратенко, А.И. Макаревич

МикроРНК-АССОЦИИРОВАННЫЕ АСПЕКТЫ ШИЗОФРЕНИИ. ПОПУЛЯЦИОННЫЕ ЧАСТОТЫ ЛОКУСА RS1625579 ГЕНА *MIR137* СРЕДИ КОРЕННЫХ ЖИТЕЛЕЙ БЕЛАРУСИ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Беларусь, 220027, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: cytoplasmic@mail.ru

В статье обобщены и представлены современные данные об ассоциации различных микроРНК с риском развития шизофрении. Определены популяционные частоты аллелей и генотипов локуса rs1625579 гена-кандидата шизофрении *MIR137* у коренных жителей Беларуси, а также распределение этих частот в шести подгруппах, дифференцированных по их географической локализации.

Ключевые слова: микроРНК, шизофрения, rs1625579, популяция, *MIR137*.

Введение

По современным представлениям, в основе психических расстройств лежат сложные взаимодействия генетических детерминант и эпигенетических факторов. Молекулярные механизмы, посредством которых реализуется эпигенетическая программа, включают модификацию гистонов хроматина, метилирование ДНК, РНК-редактирование, а также действие некодирующих РНК-молекул (короткие интерферирующие РНК, микроРНК) [1]. Долгое время основное внимание при изучении генетической этиологии психических заболеваний, в частности шизофрении, отводилось белок-кодирующим генам. Однако после открытия весьма значимого регуляторного звена в функционировании и развитии нервной системы – коротких интерферирующих РНК (siRNA) и микроРНК (miRNA), в психиатрической генетике начало интенсивно развиваться направление, основанное на анализе связи особенностей функционирования и экспрессии данных посттранскрипционных регуляторных факторов с патогенезом заболеваний.

МикроРНК представляют собой короткие (около 22 нуклеотидов) РНК-молекулы, которые, комплементарно связываясь с 3'UTR, 5'UTR или кодирующей последовательностью матричной РНК гена-мишени, приводят к репрессии трансляции или дегградации мРНК, тем самым снижая уровень экспрессии этого гена [2]. Предполагается, что данный класс РНК-молекул выполняет ключевую регуляторную роль при формировании и развитии организма, на что

указывает низкий уровень полиморфизма в пределах микроРНК-генов, а также их свойство множественного контроля (одна микроРНК может регулировать экспрессию до 100 различных генов-мишеней) [1, 3]. Показано, что микроРНК участвуют в таких важнейших биологических процессах, как клеточная дифференцировка, гематопоез, устойчивость к стрессу, метаболизм, клеточная пролиферация и апоптоз [4]. Так, по некоторым предположениям, экспрессия более 60% всех белок-кодирующих генов человека регулируется посредством микроРНК [5].

В настоящее время открыты тысячи микроРНК для широкого спектра организмов (вирусы, животные, растения) [6]. Созданы онлайн базы данных, содержащие полные нуклеотидные последовательности микроРНК, а также информацию о предполагаемых и уже установленных генах-мишенях. Крупнейшей из таких баз данных является miRBase, созданная сотрудниками Факультета естественных наук Манчестерского университета [2, 7]. Около 75% описанных микроРНК были обнаружены в тканях головного мозга человека [3]. Показано, что данный класс молекул принимает участие в регуляции основных нейрональных процессов: развития, дифференцировки, синаптической пластичности [3]. Формирование одновременно высококонсервативного и гибкого механизма регуляции функционирования генных сетей на основе микроРНК явилось необходимым условием для координации процессов,

протекающих в головном мозге, содержащем около 80 млрд. нейронов и триллионы синаптических связей [6].

Биогенез микроРНК

Большинство генов микроРНК человека представлены независимыми единицами, имеющими собственные промоторы и терминаторы и локализуемыми в промежутках между белок-кодирующими генами [8]. Однако последовательность микроРНК может быть закодирована и внутри гена-хозяина (в интронной области белок-кодирующего и небелок-кодирующего гена, в экзонной области небелок-кодирующего гена) [3].

Упрощенно биогенез микроРНК можно описать тремя основными стадиями (рис. 1).

Первая стадия включает в себя транскрипцию гена микроРНК РНК-полимеразой II (иногда РНК-полимеразой III) с образованием первичной микроРНК (pri-miRNA) молекулы размером до тысячи нуклеотидов в длину, несущей в своей структуре двуцепочечные шпилькообразные участки. На второй стадии шпильчатые структуры первичной микроРНК распознаются комплексом ядерных белков DGCR8 и Drosha (РНК-эндонуклеаза III) и разрезаются/вырезаются, образуя при этом индивидуальные «шпильки» размером около 70–100 нуклеотидов – предшественники микроРНК (pre-miRNAs). Далее предшественник микроРНК транспортируется белками Exportin-5 (XPO5) и RanGTP в цитоплазму, где происходит его процессинг (удаление петли) белком Dicer в комплексе с кофактором TRBP, в результате образуется микроРНК-дуплекс размером 21–23 нуклеотида каждой цепи. Третья стадия начинается с расплетания микроРНК-дуплекса под действием белка Helicase на два

одноцепочечных фрагмента. Та цепь («направляющая»), которая имеет менее термодинамически стабильный 5'-конец, загружается в РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RISC) образуя miRISC-комплекс. Оставшийся одноцепочечный фрагмент – «пассажирская» цепь – либо деградирует, либо входит в состав другого miRISC-комплекса, который будет распознавать мРНК-мишени отличные от miRISC с «направляющей» цепью [1, 3, 6, 9, 10].

Транскриптом клетки «сканируется» miRISC-комплексом в поисках мРНК-мишеней, способных к частичному комплементарному спариванию с основаниями микроРНК [6]. Связывание микроРНК с мРНК-мишенью, как правило, происходит в области 3'UTR мРНК, что приводит либо к репрессии трансляции белка, либо к деградации мРНК (путем привлечения клеточных компонентов деградации или с образованием Р-телец) [11, 12, 13]. Способность микроРНК воздействовать на мишень, проявляя лишь частичную к ней комплементарность, дает возможность отдельной микроРНК распознавать и блокировать множество мРНК-мишеней, тем самым регулируя экспрессию сотен генов [14, 15]. Распознавание мРНК-мишеней и образование микроРНК-мРНК комплексов главным образом зависит от 2–7 нуклеотидов, расположенных на 5'-конце («seed» region) микроРНК [3, 15]. Интересно, что ряд генов имеет множественные сайты связывания с микроРНК в 3'UTR (т.е. множество семей микроРНК могут регулировать одну мРНК-мишень), а длина данного региона мРНК может влиять на ее склонность к регуляции посредством микроРНК [15].

Ассоциация микроРНК с риском развития шизофрении

Поскольку микроРНК являются значимыми посттранскрипционными регуляторами уровня активности широкого спектра генов, изменение их функционального статуса и экспрессии может иметь весьма разнообразные проявления. Данное предположение подтверждается рядом исследований, указывающих на связь микроРНК с ревматоидным артритом, системной красной волчанкой, диабетом, рассеянным склерозом, астмой, псориазом, воспалительными заболеваниями кишечника, заболеваниями кожи, психиатрическими и неврологическими нарушениями [16]. Показано, что aberrантная экспрессия микроРНК ассоциирована с ши-

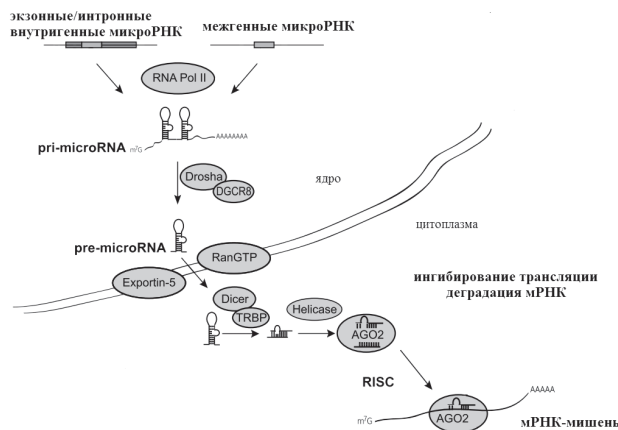


Рис. 1. Биогенез микроРНК [3]

зофренией, аутизмом, синдромом Дауна, синдромом Ретта, синдромом Мартина-Белл (умственная отсталость), депрессией [6, 16]. Для ряда тяжелых психических болезней, в частности шизофрении, характерно присутствие сопутствующих (коморбидных) заболеваний. Подобное явление можно частично объяснить изменением в работе микроРНК, являющимися одними из ключевых звеньев регуляции функционирования генных сетей, которые могут

быть связаны с этиологией одновременно нескольких заболеваний.

Поиск ассоциации микроРНК с психическими нарушениями проводится с использованием как специфических подходов, так и видоизмененных технологий, применяемых при анализе белок-кодирующих генов (табл. 1). Основными объектами исследования являются пациенты с заболеваниями, модельные животные и клеточные системы.

Таблица 1

Основные молекулярно-генетические направления микроРНК исследований психических заболеваний [1]

Тип исследования	Цель
Поиск ассоциаций генетических маркеров с заболеванием	Исследование связи полиморфизма генов микроРНК, генов-мишеней микроРНК и генов, детерминирующих биогенез микроРНК с риском развития заболевания
Исследование постмортальных образцов ткани головного мозга	Анализ экспрессионных профилей микроРНК в определенных зонах головного мозга
Исследование циркулирующей микроРНК	Количественный анализ микроРНК, циркулирующей в крови, плазме и сыворотке
Использование модельных объектов с заданными параметрами (грызуны)	-Исследование уровня экспрессии микроРНК у животных с фенотипическим проявлением психических нарушений, возникших естественно либо под воздействием внешних манипуляций; -Внесение изменений в работу ключевых ферментов биогенеза микроРНК с последующей детекцией уровня микроРНК в биологических тканях и измерением ряда параметров формирования и развития нервной системы, а также анализом морфологических, фенотипических и поведенческих особенностей модельных объектов; -Создание линий животных (нокаут, нокдаун, перепродукция) или внесение изменений (конститутивных/факультативных) у конкретного объекта, связанных с манипуляцией уровня экспрессии специфической микроРНК
Анализ <i>in vitro</i>	Исследование взаимодействия микроРНК с предполагаемой мРНК гена-мишени с использованием люциферазной репортерной конструкции
Биоинформатические исследования	-Поиск возможных генов-мишеней для конкретных микроРНК (использование математических алгоритмов); -Поиск возможных микроРНК, взаимодействующих с мРНК генов-кандидатов психических заболеваний; -Проверка влияния геномных полиморфизмов (SNP, CNV), ассоциированных с психическими заболеваниями, на уровень экспрессии или функциональную активность различных микроРНК

При исследовании эпигенетической стороны патогенетических механизмов шизофрении большое внимание уделяется анализу экспрессии микроРНК. Так, исследование экспрессии 264 микроРНК постмортальных образцов префронтального кортекса пациентов с шизофренией, шизоаффективным расстройством и здоровых лиц, выявило различия для 16 микроРНК, причем 15 из них демонстрировали

ее снижение среди пациентов с шизофренией. Наиболее явные различия (однако, не выше чем в два раза) наблюдались для miR-26b, miR-30b, miR-29b, miR-106b. Было выдвинуто предположение, что данные изменения связаны с нарушением процессов биогенеза микроРНК [17]. Интересно, что группа исследователей из Австралии, выявившая увеличение экспрессии тотальной микроРНК в области верхней

височной извилины и дорсолатеральной зоне префронтального кортекса среди пациентов с шизофренией, также связала полученные результаты с изменениями в биогенезе микроРНК, а именно с повышением процессинга микроРНК за счет компонента DGCR8 [16, 18]. В 2013 году были опубликованы результаты исследования содержимого экзосом, выделенных из нейрональной ткани постмортальных образцов префронтального кортекса, которые показали увеличение экспрессии микроРНК при психических заболеваниях, а именно has-miR-497-5p при шизофрении и has-miR-29c-3p при биполярном расстройстве [3].

Следует отметить, что преобладающая доля подобного рода данных, полученных с использованием постмортальных образцов ткани префронтального кортекса головного мозга, продемонстрировала гетерогенность результа-

тов. Так, некоторые исследователи указывают на увеличение экспрессии микроРНК, другие же – на ее снижение, третьи обнаруживают гендер-зависимые эффекты, четвертые – отсутствие каких-либо изменений у пациентов с шизофренией. Весьма сложно оценить полученную совокупность результатов, поскольку исследовательские группы использовали различные подходы (различия в размерах выборок, количестве исследуемых микроРНК, методах изолирования и детекции микроРНК) [3].

При исследовании однонуклеотидных полиморфизмов, локализованных в последовательностях генов микроРНК, участках связывания с микроРНК генов-мишеней, а также в генах, чьи продукты участвуют в биогенезе микроРНК, была выявлена ассоциация конкретных SNP с увеличением риска развития психических заболеваний, в частности шизофрении (табл. 2) [1, 3].

Таблица 2

Основные исследования связи SNPs с риском формирования шизофрении

Тип исследования	Популяции	Ген/продукт гена и локус	Результаты
Поиск ассоциации генов микроРНК с риском формирования шизофрении	Жители Скандинавии (Дания, Швеция, Норвегия)	<i>MIR206</i> rs17578796	Обнаружена ассоциация с шизофренией для объединенной выборки [19]
		<i>MIR198</i> rs1700	Обнаружена ассоциация с шизофренией для норвежской выборки [19]
	Китай	<i>MIR30E</i> rs112439044	Обнаружена ассоциация с шизофренией [20, 21]
	Япония		
	Россия	<i>MIR130B</i> rs861843	Не обнаружена связь с шизофренией [22, 23, 24]
	Китай	<i>MIR146A</i> <i>MIR499</i>	
	Германия и выборка, предоставленная Psychiatric Genomics Consortium	<i>MIR185</i>	
Поиск редких SNP в последовательностях генов микроРНК	США	let-7f-2, miR-18b, miR-188, miR-325, miR-502, miR-505, miR-509-3, miR-510, miR-660	Обнаружено 8 редких SNP в пре-микроРНК или зрелых микроРНК последовательностях генов микроРНК, локализованных на X-хромосоме, среди мужчин с диагнозом шизофрения [25]
Поиск SNP в 3'UTR области связывания с микроРНК генов, ассоциированных с шизофренией	Германия	hsa-miR-498	Обнаружена ассоциация rs3822674 3'UTR области гена <i>CPLX2</i> с когнитивным функционированием и с влиянием на репрессию активности гена <i>CPLX2</i> , осуществляемую посредством hsa-miR-498 [26]

Продолжение табл. 2

Тип исследования	Популяции	Ген/продукт гена и локус	Результаты
Поиск SNP в 3'UTR области связывания с микроРНК генов, ассоциированных с шизофренией	Италия	hsa-miR-26a-5p hsa-miR-26b-5p	SNP rs11030100 и rs11030099, локализованные в 3'UTR области гена <i>BDNF</i> , влияют на механизм взаимодействия продукта гена и hsa-miR-26a-5p и hsa-miR-26b-5p соответственно. Однако связь данных SNP с риском шизофрении не обнаружена [27]
	США	hsa-miR-326	SNP rs1130354 3'UTR области гена <i>DRD2</i> связан с репрессией транскрипции гена <i>DRD2</i> , осуществляемой посредством hsa-miR-326. Связь rs1130354 с риском шизофрении не обнаружена [28]
	Финляндия, Великобритания	hsa-miR-135b-5p	SNP rs11122396 3'UTR области гена <i>DISC1</i> влияет на взаимодействие продукта гена с hsa-miR-135b-5p. Влияние данной микроРНК на экспрессию гена наблюдается у носителей А-аллеля [29]
	—	hsa-miR-124-3p	SNPs rs10759 3'UTR области гена <i>RGS4</i> влияет на механизм взаимодействия продукта гена и hsa-miR-124-3p [3]
	—	hsa-miR-138-5p	SNP rs165599 3'UTR области гена <i>COMT</i> влияет на механизм взаимодействия продукта гена и hsa-miR-138-5p [3]
SNP в генах, чьи продукты вовлечены в процессинг микроРНК	Китай	—	SNP rs7289941 в интронной области гена <i>EIF4ENIF1</i> , участвующего в процессинге микроРНК, ассоциирован с шизофренией [30]
	Китай	—	SNP rs3757 гена <i>DGCR8</i> и rs3742330 гена <i>DICER</i> , участвующего в процессинге микроРНК, ассоциированы с шизофренией [31]

Примечание. *MIR* – обозначение гена микроРНК, miR/hsa-miR – обозначение продукта гена микроРНК

Одним из наиболее изучаемых локусов микроРНК генов в контексте ассоциации с шизофренией является однонуклеотидный полиморфизм rs1625579 гена *MIR137*. По данным крупномасштабного GWAS исследования 2014 года, включившего 36 989 пациентов с шизофренией и 113 075 здоровых людей европеоидной расы, данный локус был внесен в перечень 108 строго ассоциированных с заболеванием. Возможно, продукт исследуемого гена, microRNA-137 (miR-137), вовлечен в патофизиологические процессы шизофре-

нии посредством его участия в синаптогенезе, нейрогенезе во взрослом возрасте, нейротрансмиссии, синаптической пластичности и процессах развития нервной системы [32, 33, 34]. По данным литературы, носительство ТТ-генотипа ассоциировано с понижением экспрессии гена *MIR137* и риском развития шизофрении [1, 32, 35].

Целью нашего исследования являлось определение частот аллелей и генотипов локуса rs1625579 гена *MIR137* среди коренных жителей Беларуси, что послужит основой для по-

следующего этапа исследования, направленно-го на анализ связи локуса с риском развития шизофрении у коренных¹ жителей Беларуси.

Материалы и методы

В ходе исследования было проанализировано 295 образцов ДНК коренных жителей¹ мужского пола из 17 городов Беларуси (Мир, Слуцк, Червень, Климовичи, Кричев, Славгород, Чечерск, Кобрин, Лунинец, Береза, Лельчицы Житковичи, Мозырь, Новогрудок, Ивье, Волковыск, Городок Ула). Вся популяционная группа была условно разделена на подгруппы согласно географическому расположению: «Восток», «Восточное Полесье», «Центр», «Север», «Запад», «Западное Полесье», что позволило исследовать частоты генотипов в разных регионах Республики Беларусь.

Образцы биологического материала (ДНК лейкоцитов периферической венозной крови, выделенная методом фенол-хлороформной экстракции [36]) были взяты из популяционного ДНК-банка, созданного ранее в лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Генотипирование rs1625579 гена *MIR137* проводили методом ПЦР-РВ с использованием зондов TaqMan, разработанных сотрудниками лаборатории при помощи программы Beacon Designer 7.91.

Объем ПЦР-смеси составлял 25 мкл, состав смеси был следующим: 30–40 нг ДНК, 2х Микс (0,04 ед./мкл Diamant FAST ДНК-полимераза; 10х реакционный буфер «FAST», содержащий 1,5 mM MgCl₂, по 0,2 mM каждого из 4 дезоксириботрифосфатнуклеотидов и энхансер; 3 mM MgCl₂), по 0,3 пМ каждого из двух праймеров (F-5'-CCCTAGTTGAAAATATTTTC-3' и R-5'-GGGTCACTATTATTTAACA-3'), по 0,3 пМ каждого из двух TaqMan-зондов (FAM-5'-TGT-TAATCACAATTACATCAACTCAG-3'; HEX-5'-TGTTAATCACAATTAAATCAACTCAG-3').

ПЦР проводили на Real-Time амплификаторе Agilent Technologies Stratagene Mx 3005P по следующему протоколу: 2 мин при 95 °C, затем 10 циклов без детекции флюоресценции, каждый из которых состоял из денатурации при 95 °C в течение 15 с, отжига праймеров при 58 °C –

30 с и элонгации при 72 °C в течение 40 с, затем 35 циклов, идентичных по режиму предыдущим десяти, однако с детекцией флюоресценции.

Все анализируемые ДНК-пробы были дифференцированы в соответствии с их аллельным состоянием на три генотипических класса: Т/Т, Т/Г и Г/Г.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы Statistical Package for the Social Science (SPSS'22.0). Для анализа однородности распределения частот генотипов исследуемого локуса внутри популяции применялся метод Хи-квадрат (χ^2 Пирсона).

Результаты и обсуждение

Полученные результаты указывают на высокую частоту носительства Т-аллеля: Т-аллель – 75,9%; G-аллель – 24,1%, в целом для всей популяционной группы коренных жителей Беларуси, что согласуется с частотами европейских популяций, представленных в базе данных проекта «1000 геномов» (рис. 2) [37].

Для всех мировых популяций мажорным аллелем локуса rs1625579 гена *MIR137* является Т-аллель. В табл. 3 представлены развернутые данные частот генотипов коренных жителей Беларуси, а также мировых популяций, собранные в рамках проекта «1000 геномов» [37].

Распределение частот генотипов среди коренных жителей Беларуси соответствует таковому в популяциях Европы. Прослеживается неоднородность частот по исследуемому локусу среди мировых популяций, наиболее близкими по частотам являются популяции Восточной Азии и Америки, а также Европы и Южной Азии. Самый высокий процент встречаемости генотипа Т/Т наблюдается среди популяций Восточной Азии, что контрастирует с общеевропейскими данными. Поскольку результаты мировых исследований, касающиеся неоднозначности ассоциации локуса rs1625579 с шизофренией, получены в основном на популяциях Восточной Азии, при последующем анализе и интерпретации связи данного локуса с риском развития шизофрении среди жителей Беларуси следует проводить с учетом данной этнической гетерогенности.

Для более детального анализа белорусской популяции были исследованы частоты генотипов каждого региона в отдельности (табл. 4).

¹ Коренные жители – этнические белорусы, чьи предки как минимум в 3-х поколениях проживали на территории Беларуси



Рис. 2. Частота встречаемости аллеля Т локуса rs1625579 гена *MIR137* в мировых популяциях.

Восточная Азия представлена популяциями Китая, Японии и Вьетнама; Америка – популяциями Колумбии, США (лица мексиканского происхождения, проживающие в Лос-Анджелесе), Перу, Пуэрто-Рико; Европа – популяциями Финляндии, Великобритании, Испании, Италии и жителями штата Юта, европейского происхождения; Южная Азия – популяциями Бангладеш, Пакистана, жителями США и Великобритании, родом из Индии и Шри-Ланки; Африка – популяциями Кении, Нигерии, Гамбии, Сьерра-Леоне, а также жителями США и Барбадоса африканского происхождения

Таблица 3

Распределение генотипов по локусу rs1625579 гена *MIR137* в общемировых популяциях

Популяции	Генотипы					
	T/T		T/G		G/G	
	n	%	n	%	n	%
Коренные жители Беларуси, n = 295	178	60,3	92	31,2	25	8,5
Восточная Азия, n = 504	437	86,7	63	12,5	4	0,8
Америка, n = 347	274	79,0	67	19,3	6	1,7
Европа, n = 503	314	62,4	166	33,0	23	4,6
Южная Азия, n = 489	288	58,9	184	37,6	17	3,5
Африка, n = 661	306	46,3	273	41,3	82	12,4

Примечание. Расшифровка состава представленных популяций идентична таковой для рис. 2

Таблица 4

Распределение генотипов по локусу rs1625579 гена *MIR137* в шести регионах Беларуси

Популяция	Генотипы					
	T/T		T/G		G/G	
	n	%	n	%	n	%
Восток, n = 53	36	67,9	15	28,3	2	3,8
Восточное Полесье, n = 46	26	56,5	19	41,3	1	2,2
Запад, n = 48	30	62,5	12	25,0	6	12,5
Западное Полесье, n = 49	25	51	18	36,7	6	12,2
Север, n = 49	27	55,1	18	36,7	4	8,2
Центр, n = 50	34	68,0	10	20,0	6	12,0

Примечание. n – количество участников исследования; коренные жители Беларуси представлены лицами мужского пола

В целом распределение частот генотипов по регионам достоверно не различалось ($P > 0,05$). Однако было выявлено значимое увеличение доли гомозигот Т/Т (66,2%; $P < 0,05$) в объединенной группе «Запад + Центр + Восток» и снижение доли гетерозигот Т/Г (24,5%; $P < 0,05$) по отношению к группе регионов «Север + Западное Полесье + Восточное Полесье» (Т/Т – 54,2%; Т/Г – 38,2%). Что касается частоты встречаемости генотипа Г/Г, то наблюдалось достоверное снижение носителей данного генотипа в объединенной группе «Восток + Восточное Полесье» по отношению к совокупности остальных регионов ($P = 0,015$).

Заключение

Нарастающее количество данных генетических исследований указывает на значимую роль микроРНК при комплексных нейродегенеративных заболеваниях и в частности шизофрении, а также на перспективность дальнейших исследований в данной области, касающуюся как унифицирования и стандартизации методов лабораторного исследования микроРНК, так и систематизации и внедрения биоинформатических подходов в анализе данных. Создание полномасштабных генных сетей с ключевыми регуляторными узлами в виде микроРНК-генов позволит выйти на новый уровень, необходимый в анализе комплексных мультифакториальных заболеваний, а скрининг популяций по возможным патогенетическим локусам позволит разработать наиболее эффективные и своевременные медико-профилактические мероприятия.

Данные частот генотипов и аллелей локуса rs1625579 гена *MIR137* среди коренных жителей Беларуси будут положены в основу последующего этапа исследования, направленного на анализ связи локуса с риском развития шизофрении у жителей Беларуси, в ходе которого планируется исследовать частоты аллелей и генотипов rs1625579 среди пациентов с шизофренией, а данные популяционной выборки будут использованы в качестве контрольной группы.

Список использованных источников

1. Issler, O. Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders / O. Issler, A. Chen // *Nat Rev Neurosci.* – Vol. 16(4). – 2015. – P. 201–212.

2. Almeida, M.I. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers / M.I. Almeida, R.M. Reis, G.A. Calin // *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* – 2011. – Vol. 717. N 1. – P. 1–8.

3. Hommers, L.G. Heterogeneity and individuality: microRNAs in mental disorders / L.G. Hommers, K. Domschke, J. Deckert // *J Neural Transm (Vienna).* – Vol. 122(1). – Jan 2015. – P. 79–97.

4. He, L. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation / L. He, G.J. Hannon // *Nature Reviews Genetics.* – 2004. – Vol. 5. N 7. – P. 522–531.

5. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs / R.C. Friedman [et al.] // *Genome research.* – 2009. – Vol. 19. N. 1. – P. 92–105.

6. Davis, G.M. MicroRNAs: Not “Fine-Tuners” but Key Regulators of Neuronal Development and Function / G.M. Davis, M.A. Haas, R. Pocock // *Front Neurol.* – 2015. – P. 245.

7. MiRBase: the microRNA database [Electronic resource] / Griffiths-Jones lab at the Faculty of Life Sciences, University of Manchester. – Mode of access: <http://www.mirbase.org>. – Date of access: 20.05.2014.

8. Jamalkandi, S.A. Human RNAi pathway: crosstalk with organelles and cells / S.A. Jamalkandi, E. Azadian, A. Masoudi-Nejad // *Functional and integrative genomics.* – 2014. – Vol. 14. N 1. – P. 31–46.

9. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation / J. Winter [et al.] // *Nature cell biology.* – 2009. – N 11(3). – P. 228–234.

10. Faller, M. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat / M. Faller, F. Guo // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms.* – 2008. – N 1779 (11). – P. 663–667.

11. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization / Y. Lee [et al.] // *EMBO J.* – 2002. – P. 4663–4670.

12. Pasquinelli, A.E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship / A.E. Pasquinelli // *Nat Rev Genet.* – 2012. – P. 271–82.

13. Jain, S. The discovery and analysis of P Bodies / S. Jain, R. Parker // *AdvExp Med Biol.* – 2013. – P. 23–43.

14. Carroll, A.P. Understanding principles of miRNA target recognition and function through integrated biological and bioinformatics approaches / A.P. Carroll, G.J. Goodall, B. Liu // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. – 2014. – P. 361–379.
15. Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions / D.P. Bartel // *Cell*. – 2009. – P. 215–233.
16. Ha, T.Y. MicroRNAs in Human Diseases: From Autoimmune Diseases to Skin, Psychiatric and Neurodegenerative Diseases / T.Y. Ha // *Immune Netw*. – Vol. 11 (5) – 2011. – P. 227–244.
17. MicroRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder / D.O. Perkins [et al.] // *Genome Biol*. – 2007. – P. 27.
18. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis / N.J. Beveridge [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2010. – P. 1176–1189.
19. Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology / T. Hansen [et al.] // *PLoS One*. – 2007. – P. 873.
20. MicroRNAs and target site screening reveals a pre-microRNA-30e variant associated with schizophrenia / Y. Xu [et al.] // *Schizophr Res*. – 2010. – P. 219–227.
21. Watanabe, Y. Replication in a Japanese population that a MIR30E gene variation is associated with schizophrenia / Y. Watanabe // *Schizophr Res*. – 2013. – P. 596–597.
22. Burmistrova, O.A. MicroRNA in schizophrenia: genetic and expression analysis of miR-130b (22q11) / O.A. Burmistrova [et al.] // *Biochemistry Mosc*. – 2007. – P. 578–582.
23. Association between two single nucleotide polymorphisms at corresponding microRNA and schizophrenia in a Chinese population / M. Zou [et al.] // *MolBiol Rep*. – 2012. – P. 3385–3391.
24. Investigation of the involvement of MIR185 and its target genes in the development of schizophrenia / A.J. Forstner [et al.] // *J Psychiatry Neurosci*. – 2014. – P. 386–396.
25. Evidence for X-chromosomal schizophrenia associated with microRNA alterations / J. Feng [et al.] // *PLoS One*. – 2009. – P. 6121.
26. Modification of cognitive performance in schizophrenia by complexin 2 gene polymorphisms / M. Begemann [et al.] // *Arch Gen Psychiatry*. – 2010. – P. 879–888.
27. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression is regulated by microR-NAs miR-26a and miR-26b allele-specific binding / V. Caputo [et al.] // *PLoSOne*. – 2011. – P. 28 656.
28. MicroRNA-9 and microRNA-326 regulate human dopamine D2 receptor expression, and the microRNA-mediated expression regulation is altered by a genetic variant / S. Shi [et al.] // *J Biol Chem*. – 2014. – P. 13 434–13 444.
29. Allele-specific regulation of DISC1 expression by miR-135b-5p / M. Rossi [et al.] // *Eur J Hum Genet*. – 2014. – P. 840–843.
30. Systematic association analysis of microRNA machinery genes with schizophrenia informs further study / F. Zhang [et al.] // *Neurosci Lett*. – 2012. – P. 47–50.
31. Evaluation of six SNPs of MicroRNA machinery genes and risk of schizophrenia / Y. Zhou [et al.] // *J MolNeurosci*. – 2013. – P. 594–599.
32. A GWAS SNP for Schizophrenia Is Linked to the Internal MIR137 Promoter and Supports Differential Allele-Specific Expression / A. Warburton [et al.] // *Schizophr Bull*. – 2015. – P. 144.
33. The impact of MIR137 on dorsolateral prefrontal-hippocampal functional connectivity in healthy subjects. / B. Liu [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2014. – P. 2153–2160.
34. MIR137 gene and target gene CACNA1C of miR-137 contribute to schizophrenia susceptibility in Han Chinese / F. Guan [et al.] // *Schizophr Res*. – 2014. – P. 97–104.
35. MIR137HG risk variant rs1625579 genotype is related to corpus callosum volume in schizophrenia / V.S. Patel [et al.] // *NeurosciLett*. – 2015. – P. 44–49.
36. Mathew, C.G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA / C.G. Mathew // *Methods Mol Biol*. – 1985. – P. 31–34.
37. 1000 Genomes: A Deep Catalog of Human Genetic Variation – [Electronic resource] – 2016. – Mode of access: http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation/Population?r=1:98502434-98503434;v=rs1625579;vdb=variation;vf=1146801. – Date of access: 28.09.2016.

H.S. Kandratsenka, A.I. Makarevich

MiRNA-ASSOCIATED ASPECTS OF SCHIZOPHRENIA. FREQUENCIES OF RS1625579 POLYMORPHISM OF *MIR137* GENE IN THE POPULATION OF INDIGENOUS PEOPLE OF BELARUS

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

Accumulated data of the association of miRNAs with schizophrenia are presented in the article. The frequencies of rs1625579 of gene *MIR137* polymorphism which is the candidate of schizophrenia, are defined for the population of indigenous people of Belarus as well as their distribution in the six ethnogeographic regions is presented.

Key words: miRNAs, schizophrenia, rs1625579, population, *MIR137*.

Дата поступления статьи 3 октября 2016 г.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ У ЖЕНЩИН С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЧЕЧЕНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Чеченский государственный университет
Россия, Чеченская Республика, 364907, г. Грозный, ул. Шерипова, 32
e-mail: petimat-lg@rambler.ru

Молекулярно-генетический анализ полиморфных вариантов ключевых генов репарации ДНК у женщин чеченской популяции показал их неоднозначную роль в формировании и развитии раковых опухолей груди. Отмечено отсутствие связи между состоянием системы репарации ДНК и повышенной чувствительностью организма к канцерогенезу. Показано увеличение частоты встречаемости минорных аллелей по ряду полиморфных вариантов генов репарации ДНК у чеченских женщин. Значимый протективный эффект был продемонстрирован для полиморфного варианта C3310G гена *ERCC5*.

Ключевые слова: рак молочной железы, чеченская популяция, полиморфные варианты генов эксцизионной репарации.

Введение

Решение проблемы злокачественных новообразований остается на сегодняшний день актуальной задачей для исследователей всего мира. Несмотря на существенный прогресс, достигнутый в понимании базовых механизмов канцерогенеза, лечении и профилактике раковых опухолей, число раковых больных не снижается. Более того, эпидемиологические исследования прогнозируют, что демографические изменения приведут к заметному увеличению числа диагнозов «рак» в течение ближайших 20 лет, при этом основными диагностируемыми типами злокачественных новообразований называются злокачественные новообразования кожи, предстательной и молочной железы [1].

После того как в конце XX века были обнаружены и картированы гены *BRCA1* и *BRCA2*, участвующие в поддержании целостности генома, мутации в которых увеличивали риск развития рака молочной железы в несколько десятков раз, генетические причины канцерогенеза приобрели доминирующий характер. Тем не менее, попытки свести все случаи возникновения опухолей груди к нарушениям только в генах-супрессорах опухолей не увенчались успехом. Все множество причин развития рака молочной железы (РМЖ) можно свести к двум основным категориям: нарушение метаболизма эстрогенов

и сбой в системе репарации ДНК вследствие мутаций, накапливающихся в репаративных генах [2]. Однако результаты многочисленных молекулярно-генетических исследований варьируют в широких пределах в зависимости от множества факторов, включая семейный анамнез, возраст, возраст манифестации, молекулярный подтип опухоли и другие. Как показывает этногеографический анализ данных по изучению молекулярно-генетических механизмов возникновения и развития рака молочной железы, информативность генных локусов в значительной степени зависит от расово-этнической принадлежности пациентов с онкологическими заболеваниями, что подчеркивает важность проводимых популяционных исследований в этой области [3–7]. Эволюционно сложившиеся популяционные особенности генетической программы индивидов, по-видимому, обуславливают специфические особенности ответной реакции на одни и те же факторы в разных популяциях, расовых и этнических группах.

В настоящей работе представлены результаты ассоциативного исследования вклада генов эксцизионной репарации, продукты которых участвуют в поддержании целостности генома, в процесс злокачественного перерождения ткани молочной железы у женщин чеченского происхождения.

Материалы и методы

Для анализа полиморфизма генов нами была выделена геномная ДНК из венозной крови женщин чеченской национальности, находящихся на лечении в ГБУ «Республиканский онкологический диспансер» Чеченской Республики (ЧР), а также состоящих на учете в учреждениях здравоохранения ЧР по месту проживания. В группу исследования вошли 218 женщин с клинически установленным диагнозом РМЖ и 364 женщины контрольной группы без онкологической патологии на момент забора крови и семейного анамнеза. Возраст обследованных пациенток составил от 24 до 60 лет. Все женщины, принявшие участие в данной исследовательской работе, дали свое информированное согласие.

Выделение ДНК проводилось методом универсальной пробоподготовки, основанной на осаждении примесей на ионообменниках. Генотипирование изучаемых локусов осу-

ществляли методом тетрапраймерной ПЦР с использованием двух внутренних и двух внешних аллель-специфичных праймеров, дизайн которых осуществлялся посредством программы Primer 3. Для визуализации результатов генотипирования использовался метод горизонтального электрофореза. Для выделения ДНК и постановки ПЦР были использованы наборы реагентов производства ООО «Лаборатория Изоген»: Diatom™ DNA Prep 200, GenePak® PCR Core.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета MS Excel. Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга определяли по стандартным формулам.

Характеристика исследованных локусов представлена в табл. 1. Выбор локусов для генотипирования основывался на литературных данных.

Таблица 1

Характеристика исследованных полиморфизмов генов репарации *ERCC2*, *ERCC5*, *XPC*, *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *OGG1*

Ген	Местоположение	Тип мутации	Обозначение	Эффект
ERCC2 – ERCC excision repair 2, TFIIH core complex helicase subunit XPD	19q13.3 rs1799793	Транзиция	862 G>A	Миссенс-мутация Asp312Asn
	19q13.3 rs13181	Трансверсия	304 T>G	Миссенс-мутация Lys751Gln
ERCC5 – excision repair cross-complementation group 5, endonuclease XPG	13q22-q34 rs17655		3310G>C	Миссенс-мутация Asp1104His
XPC – XPC complex subunit, DNA damage recognition and repair factor (p125)	3p25.1 rs2228000	Транзиция	1496C>T	Миссенс-мутация Ala499Val
XRCC1 – X-ray repair cross complementing 1	19q13.2 rs 25487		1196A>G	Миссенс-мутация Gln399Arg
	19q13.2 rs1799782		580C>T	Миссенс-мутация Arg194Trp
XRCC2 – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	7q36.1 rs3218536		563G>A	Миссенс-мутация Arg188His
XRCC3 – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3	14q32.3 rs861539		722C>T	Миссенс-мутация / Thr241Met
OGG1 – 8-oxoguanine DNA glycosylase (HOGG1)	3p26.2 rs1052133	Трансверсия	977C>G	Миссенс-мутация Ser326Cys Pro332Ala

Результаты и обсуждение

Биологические процессы организма генетически запрограммированы, и их нормальное течение зависит от безошибочной работы белков, являющихся продуктами детерминирующих их генов. Стабильность генетической информации, в свою очередь, обеспечивается системами репарации ДНК. Значение систем репарации ДНК для нормального функционирования организма человека становится совершенно очевидным при анализе заболеваний, обусловленных нарушением репарационных механизмов, вызванным, в свою очередь, различными повреждениями в соответствующих генах репарации. Кроме того, внутрипопуляционный полиморфизм, обусловленный наличием SNP в последовательностях генов, может оказывать влияние на эффективность транскрипции и трансляции данных генов и процессов репарации в целом, а также на предрасположенность к ряду заболеваний.

В настоящей работе анализируются результаты генотипирования полиморфных вариантов генов эксцизионной репарации (NER) комплементационной группы XP: *ERCC5 (XPG)* G/C (Asp1104His); *ERCC2 (XPD)* A/G (Asp312Asn); *ERCC2 (XPD)* G/T (Lys751Gln); *XPC* C/T (Ala499Val); генов группы (BER) радиационных повреждений ДНК: *XRCC1* A/G (Gln399Arg); *XRCC1* C/T (Arg194Trp); *XRCC2* A/G (Arg188His); *XRCC3* C/T (Thr241Met); а также гена эксцизионной репарации (BER) 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы *hOGG1* C/G (Ser326Cys) в чеченской популяции. Для всех исследуемых аллелей выявлено соответствие распределения частоты генотипов равновесию Харди-Вайнберга.

Полученные в ходе работы данные по частоте аллельных вариантов изученных генов, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Частота полиморфных вариантов генов репарации у женщин чеченской популяции с раком молочной железы

Ген	Полиморфизм	Генотипы	Частота, %		P
			Контроль n = 364	РМЖ n = 218	
<i>ERCC2</i>	862G>A	AA	20,62	16,39	<i>P</i> > 0,05
		AG	51,41	47,54	
		GG	27,97	36,07	
<i>ERCC2</i>	304T>G	G/G	28,70	27,86	
		T/G	50,31	47,76	
		T/T	20,99	24,38	
<i>ERCC5</i>	3310G>C	C/C	38,73	51,82	<i>P</i> < 0,05
		C/G	42,65	38,18	
		G/G	18,63	10,00	<i>P</i> > 0,05
<i>XPC</i>	1496C>T	C/C	67,92	63,64	
		C/T	30,42	33,33	
		T/T	1,67	3,03	
<i>XRCC1</i>	1196A>G	A/A	15,82	15,57	
		A/G	48,42	44,26	
		G/G	35,76	40,16	
<i>XRCC1</i>	580C>T	C/C	90,34	89,34	
		C/T	9,66	10,66	
		T/T	0	0	
<i>XRCC2</i>	563G>A	G/G	90,65	94,44	
		G/A	9,35	5,56	

Продолжение табл. 2

Ген	Полиморфизм	Генотипы	Частота, %		P
			Контроль n = 364	PMЖ n = 218	
XRCC2	563G>A	A/A	0	0	P > 0,05
XRCC3	722C>T	C/C	50,75	45,08	
		C/T	39,94	45,90	
		T/T	9,31	9,02	
OGG1	977C>G	C/C	52,86	50,00	
		C/G	38,57	44,57	
		G/G	8,57	5,43	

Ген *ERCC2* (*XPB*) занимает участок протяженностью в 2001 bp в хромосоме 19. Кодированный белок обладает АТФ-зависимой ДНК-хеликазной активностью и принадлежит Rad3/*XPB* подсемейству геликаз. В составе транскрипционного фактора BTF2/TFIIH *XPB* геликаза принимает участие в эксцизионной репарации нуклеотидов. Вполне очевидно, что нарушения в структуре гена будут способствовать уменьшению репаративной способности и, как следствие, увеличивать риск развития заболеваний. В *ERCC2* идентифицировано несколько однонуклеотидных замен, приводящих к соответствующим заменам аминокислот в строении белка: Ile199Met (C/G), His201Tyr (C/T), Asp312Asn (G/A) и Lys751Gln (A/C). Есть данные об ассоциации полиморфного варианта 751Gln (T) с риском развития рака молочной железы у женщин европейской и смешанной популяции [7], в то время как роль замены Asp312Asn в генезе РМЖ не была доказана.

В данном исследовании вклад полиморфных вариантов локуса *XPB* Lys751Gln и Asp312Asn в риск развития РМЖ у женщин чеченской популяции была выявлена тенденция к повышению частоты гомозиготных генотипов по минорным аллелям обоих полиморфных вариантов у женщин со злокачественными новообразованиями груди: частота генотипа GG полиморфного локуса *ERCC2* 862 A/G у пациентов составила 36,07%, в то время как частота аналогичного генотипа в контрольной группе была значительно ниже – 27,97%; частота гомозиготного генотипа по минорному аллелю T полиморфного варианта *ERCC2* 304 G/T также превышала значения частоты гено-

типа TT в группе здоровых женщин: 24,38% против 20,99%, однако статистически достоверного уровня различия не достигали.

Другой исследованный ген группы семейства XP *ERCC5* (*XPB*), локализованный в длинном плече хромосомы 13 (13q33), кодирует специфическую эндонуклеазу с молекулярной массой 133 кДа, которая расщепляет фосфодиэфирные связи в участке повреждения ДНК, а также требуется для неферментативного 5'-надрезания гетеродимера XPF/*ERCC1* в процессе эксцизионной репарации оснований (NER) [8]. Для гена *ERCC5* известно несколько однонуклеотидных замен, снижающих функциональную активность белка [3]. В настоящем исследовании изучалась роль полиморфного варианта гена *ERCC5* 3310G/C (rs17655), характеризующегося заменой аминокислоты Asp на His, в формировании злокачественной опухоли груди. Полученные нами данные по частоте аллельных вариантов гена *XPB* Asp1104His в группе пациентов с РМЖ и здоровых женщин показывают обратный эффект замены C на G в локусе *XPB*. В группе пациентов наблюдается снижение уровня гомозиготных и гетерозиготных носителей минорного аллеля G по сравнению с контролем, а гомозиготы дикого типа встречаются в 1,3 чаще. Ассоциативный анализ полиморфизма с риском развития РМЖ продемонстрировал статистически значимый протективный характер ($P = 0,032$) минорного аллеля G в процессе образования злокачественной опухоли груди ($OR = 0,49$ при 95% $CI = 0,21–0,921$). В то же время, мета-анализ работ, посвященных исследованиям ассоциаций полиморфизмов гена *ERCC5*, не выявил связи rs17655 с форми-

рованием раковых опухолей груди [3]. Более того, изучение вклада данного полиморфизма в этиологию рака других локализаций, в частности рака желудка, опухолей мозга также не выявил значимых различий с контрольной группой в отличие от других полиморфизмов этого гена: AA генотип rs751402 гена *ERCC5* значительно увеличивал риск рака желудка по сравнению с GG генотипом ($OR = 2,61$, 95% $CI = 1,23-5,49$; $P = 0,005$) [9]. Вероятно, замена C3310G гена *ERCC5* незначительно влияет на функциональную активность кодируемого им белка, а в нашем исследовании проявляет протекторную роль, предотвращая процесс развития опухоли груди.

Выявление тиминовых димеров происходит при участии белкового комплекса XPC-hHR23, который привлекает к месту повреждения транскрипционный фактор TFIIH – комплекса, состоящего из 9 белковых субъединиц разной активности, включая хеликазную и транскрипционную. Белок XPC кодируется геном XPC, расположенным в хромосоме 3, и играет важную роль на начальном этапе эксцизионной репарации нуклеотидов (NER). Учитывая ключевую роль гена XPC в системе репарации ДНК, естественно предположить, что мутации в локусе XPC будут иметь значительное влияние на метаболические процессы, опосредованные участием кодируемого им белка. Одна из самых распространенных и известных мутаций в этом локусе – это мутация, приводящая к развитию пигментной ксеродермы. По данным международных баз данных, в гене XPC обнаружено более 2800 однонуклеотидных замен, так или иначе влияющих на работу детерминируемого белка. Существует достаточно большое количество публикаций, указывающих на наличие взаимосвязи ряда полиморфных вариантов гена XPC с риском развития злокачественных новообразований [5, 6, 10, 11].

Нами исследована частота полиморфного варианта гена XPC 1496 C/T, приводящего к образованию миссенс-мутации Ala499Val у женщин с установленным диагнозом рак молочной железы и у здоровых женщин. Результаты генотипирования показывают, что у женщин со злокачественными новообразованиями груди в 2 раза чаще выявляется гомозиготный генотип по минорному аллелю TT

(3,03%) в сравнении с контрольной группой (1,67%). Частота гетерозиготного генотипа в исследованной выборке онкобольных составляет 33,33% против 30,42% в группе женщин, у которых на момент забора крови не было выявлено злокачественных опухолей. Различия статистически не значимы, но интересно отметить, что в мета-анализе 32 публикаций, в которых оценивалась ассоциация между полиморфизмом гена XPC Ala499Val и риском развития рака различной локализации, значительные корреляции между полиморфным вариантом гена XPC Ala499Val и риском развития рака молочной железы были обнаружены в основном для азиатских популяций [4]. Наши предыдущие исследования показали, что по популяционным частотам некоторых полиморфных вариантов генов репарации чеченская популяция ближе к азиатским [12].

Ген *XRCC1*, картированный на длинном плече хромосомы 19 (19q13.2), кодирует белок, участвующий в координации и регуляции эксцизионной репарации оснований ДНК (BER), возникающих в результате ионизирующей радиации, УФ и воздействия алкилирующих агентов. На сегодняшний день изучено множество единичных нуклеотидных замен в кодирующих участках гена, обуславливающих генетический полиморфизм, которые приводят к конформационным изменениям кодируемого белка и ассоциированы с повышенным риском рака различных локализаций. Наиболее изученными полиморфизмами гена *XRCC1* являются 1196A/G (rs25487) и C589T (rs1799782). В настоящем исследовании генотипы по данным полиморфизмам гена *XRCC1* 1196A/G (rs25487) и C589T (rs1799782) распределились следующим образом: наблюдаемая в группе женщин с РМЖ частота гомозигот по минорному аллелю G полиморфного варианта 1196A/G гена *XRCC1* составила 40,16% в то время как среди здоровых женщин частота соответствующего генотипа 35,76%. Однако гетерозиготные носители аллеля G в когорте пациентов встречались реже по сравнению с контрольной группой: 44,26% против 48,42%. Возможно, здесь наблюдается эффект сверхдоминирования.

Другой полиморфный вариант гена *XRCC1* определяет замену Arg194Trp. Молекулярно-генетический анализ полиморфного варианта

гена *XRCC1* 580 C/T в данном исследовании не выявил ни одного случая гомозиготного генотипа по минорным аллелям в исследованной популяционной группе. Частота гетерозиготных носителей минорного аллеля Т в группе пациенток равна 10,66%, что незначительно выше частоты данного показателя в контрольной группе – 9,66%. Ассоциативный анализ не показал статистически достоверных различий между исследованными группами по обоим изученным вариантам гена *XRCC1*.

Наряду с известными генами *BRCA1* и *BRCA2* в ликвидации двунитевых разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации участвуют гены *XRCC2* и *XRCC3*, продукты которых облегчают связывание белка RAD51 с поврежденным сайтом. Понятно, что нарушения в последовательности генов *XRCC2* и *XRCC3* будут способствовать сбою в системе репарации ДНК, что, в свою очередь, обуславливает нарушения нормального метаболизма клетки и провоцирует возникновение опухолей. Проведенное исследование полиморфных вариантов гена *XRCC2* Arg188His у чеченских женщин не выявило в изученных выборках гомозигот по минорному аллелю А. Частота гетерозиготного генотипа и минорного аллеля полиморфного варианта Arg188His гена *XRCC2* у здоровых женщин (9,35% и 4,67%, соответственно) одинаково в 1,68 раз выше по сравнению с частотой данных аллелей у женщин с раком груди (5,56% и 2,78% соответственно). Предположительно, повышенная частота указывает на протективный характер данного аллеля в риске развития рака молочной железы ($OR = 0,57$ 95% $CI = 0,71-4,17$). Подобный эффект был обнаружен и для полиморфного варианта гена *ERCC5* C3310G. Однако применительно к полиморфному локусу G563A гена *XRCC2* результат носит недостоверный характер ($P = 0,326$).

Для минорного аллеля Т полиморфного варианта гена *XRCC3* Thr241Met встречается у пациенток с РМЖ и контрольной группе практически с одинаковой частотой (9,02% и 9,31% соответственно). Однако частота гетерозиготного генотипа по полиморфному варианту гена *XRCC3* Thr241Met C/T у пациенток с РМЖ (45,9%) выше в сравнении со здоровыми женщинами (39,94%). Статистический анализ сопряженности гетерозиготного носительства

мутантного аллеля с РМЖ показывает тенденцию к увеличению риска развития онкопатологии ($OR = 1,28$ 95% $CI = 0,84-1,94$), однако различия статистически значимы ($P = 0,283$).

Ген 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы *hOGG1* (human 8-oxoguanine DNA glycosylase) локализуется в коротком плече хромосомы 3 (3p26.2). Один из полиморфизмов гена *hOGG1* C977G rs1052133 ассоциирован со сниженной активностью фермента 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы, что повышает вероятность злокачественного перерождения клеток. Показано увеличение риска возникновения рака легкого, пищевода, гортани, желудка и простаты у носителей Cys-аллеля гена *hOGG1* [13]. Однако, генотипирование данного полиморфизма у женщин чеченской популяции не выявило ассоциаций Cys-аллеля гена *hOGG1* rs1052133 с раком молочной железы. Частота гомозигот по минорному аллелю у здоровых женщин составила 8,57% против 5,43% в группе женщин с РМЖ. Анализ частоты гетерозиготных генотипов в изученных группах показывает, что в группе пациентов этот показатель превышает контрольный уровень – 44,57% против 38,57%, однако результаты статистически незначимы. Являются ли полученные результаты характерными только для чеченской популяции покажут дальнейшие исследования.

Заключение

Молекулярно-генетический анализ вклада полиморфных вариантов ключевых генов репарации ДНК, проведенный в настоящем исследовании показывает, что роль нарушений в генах репарации в развитии раковых опухолей груди неоднозначна, что, очевидно, объясняется сложным характером взаимодействий между генами. Мы не нашли подтверждения взаимосвязи между состоянием системы репарации ДНК и повышенной чувствительностью организма к канцерогенезу. Результаты проведенного исследования показали увеличение частоты встречаемости гомозиготного по минорным аллелям и гетерозиготных генотипов по большинству изученных полиморфизмов генов репарации ДНК у чеченских женщин. Наибольший вклад в риск развития рака молочной железы у чеченских женщин отмечается для полиморфных вариантов гена *XPB* Lys751Gln и Asp312Asn, генов *XPC* 1496 C/T

и *XRCC3* Thr241Met. Однако различия носили недостоверный характер, что возможно объясняется недостаточной величиной выборки. В то же время значимый протективный эффект был продемонстрирован для полиморфного варианта C3310G гена *ERCC5*. Аналогичная тенденция была выявлена и для другого полиморфизма гена *XRCC2* Arg188His, но протективный эффект не достиг статистической значимости.

Таким образом, для подтверждения результатов настоящего исследования с целью установления связи между изученными полиморфизмами генов репарации ДНК и риском развития рака молочной железы в чеченской популяции необходимы дальнейшие исследования с увеличенным размером выборки.

Список использованных источников

1. Обзор современных эпидемиологических аспектов по онкопатологии / Д.Х. Рыбалкина [и др.] // Гигиена труда и медицинская экология. – 2015. – № 4 (49). – С. 31–48.
2. Кулигина, Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы / Ш. Кулигина // Практическая онкология. – 2010. – Т. 11. № 4. – С. 203–216.
3. Ding, D.P. Lack of association between XPG Asp1104His and XPF Arg415Gln polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis of case-control studies / D.P. Ding, X.F. He, Y. Zhang // Breast Cancer Res Treat. – 2011. – N 129 (1). – P. 203–209.
4. Associations of Lys939Gln and Ala499Val polymorphisms of the XPC gene with cancer susceptibility: a meta-analysis / J. He [et al.] // Int J Cancer. – 2013. – N 133 (8). – P. 1765–1775.
5. Potentially functional variants in the core nucleotide excision repair genes predict survival in Japanese gastric cancer patients / Y. Li [et al.] // Carcinogenesis. – 2014. – N 35 (9). – P. 2031–2038.
6. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and susceptibility to colorectal cancer in the Polish population / K. Paszkowska-Szczur [et al.] // Mol Biol Rep. – 2015. – N 42 (3). – P. 755–764.
7. XPD Asp312Asn and Lys751Gln polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis / Y. Yan [et al.] // Tumour Biol. – 2014. – N 35 (3). – P. 1907–1915.
8. The human XPG gene: gene architecture, alternative splicing and single nucleotide polymorphisms / S. Emmert [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2001. – N 29 (7). – P. 1443–1452.
9. Association between ERCC5 gene polymorphisms and gastric cancer risk / B.W. Guo [et al.] // Mol Neurobiol. – 2016. – N 53 (4). – P. 2705–2714.
10. Association of nucleotide excision repair pathway gene polymorphisms with gastric cancer and atrophic gastritis risks / J. Liu [et al.] // Oncotarget. – 2016. – N 7 (6) – P. 6972–6983.
11. Association between CCND1 and XPC polymorphisms and bladder cancer risk: a meta-analysis based on 15 case-control studies / Y. Wang [et al.] // Tumour Biol. – 2014. – N 35 (4). – P. 3155–3165.
12. Бисултанова, З.И. Вклад полиморфных вариантов гена эксцизионной репарации ERCC2 Asp312Asn и Lys751Gln в риск развития рака молочной железы у женщин чеченской популяции / З.И. Бисултанова, З.Р. Бисултанова // Сборник статей ППС ЧГУ. – 2015. – С. 118–122.
13. Lack of association between the hOGG1 gene Ser326Cys polymorphism and gastric cancer risk: evidence from a case-control study and a meta-analysis / W.G. Hu [et al.] // Genet Mol Res. – 2015. – N 14 (4). – P. 14 670–14 679.
14. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer / L.A. Aaltonen [et al.] // Science. – 1993. – N 260 (5109). – P. 812–816.
15. Bartsch, R. Trastuzumab in the management of early and advanced stage breast cancer / R. Bartsch, C. Wenzel, G.G. Steger // Biologics. – 2007. – N 1 (1). – P. 19–31
16. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer // R.Fishel [et al.] // Cell. – 1993. – Vol. 75. – P. 1027–1038.
17. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer / F.S. Leach [et al.] // Cell. – 1993. – Vol. 75. – P. 1215–1225.
18. Distribution of mutations in the human xeroderma pigmentosum group A gene and their relationships to the functional regions of the DNA damage recognition protein / J.C. States [et al.] // Hum. Mutat. – 1998. – Vol. 12, N 2. – P. 103–113.

Z.I. Bisultanova, Z.R. Bisultanova, P.M. Dzhambetova

ANALYSIS OF POLYMORPHIC VARIANTS OF GENES EXCISION REPAIR OF WOMEN WITH BREAST CANCER IN THE CHECHEN POPULATION

Chechen State University
Russia, Chechen Republic, 364907, Grozny

Molecular genetic analysis of polymorphic variants of key genes of DNA repair of women of the Chechen population has shown an ambiguous role in the formation and development of breast cancer tumors. The lack of connection between the state system of DNA repair and increased sensitivity to carcinogenesis was noted. The increase of frequency of occurrence for a number of minor alleles of polymorphic variants of DNA repair genes in Chechen women was shown. A significant protective effect was demonstrated for a polymorphic C3310G *ERCC5* gene variant.

Key words: breast cancer, the Chechen population, polymorphic variants of genes excision repair.

Дата поступления статьи 30 сентября 2016 г.

И.Э. Рубель¹, О.Ю. Баранов¹, С.В. Пантелеев¹, О.А. Разумова¹, В.А. Гущин², В.В. Макаров²

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ ХВОЙНЫХ НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (Краткое сообщение)

¹Институт леса НАН Беларуси

Республика Беларусь, 246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71; e-mail: illiarubel@yahoo.com

²НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 12

В статье описывается разнообразие вирусоподобных генетических элементов хвойных. Данные для последующего анализа и поиска вирусоподобных последовательностей в растительном геноме были получены в результате высокопроизводительного секвенирования на основе полупроводниковой детекции протонов (технология Ion Torrent). Был аннотирован ряд последовательностей, имеющих сходство с ранее описанными вирусоподобными генетическими элементами. Среди них – ретротранспозоны групп Ty3/gypsy и Ty1/copia, содержащие длинные концевые повторы (LTR) и широко встречающиеся в геноме ели, а также ретротранспозоны, не содержащие LTR и относящиеся к семейству LINE.

Ключевые слова: вирусоподобные генетические элементы, ретротранспозоны, высокопроизводительное секвенирование, хвойные.

Введение

Трудно переоценить значение хвойных древесных растений как для хозяйственной деятельности человека, так и для биосферы в целом. Древесные растения, как важнейшая часть леса, выполняют ряд функций: сырьевую, санитарно-гигиеническую, климато-, почво-, гидросферо- и биотопреобразующую и т.д. В целом, все многообразие значений можно свести к трем основным группам: 1) древесина (различного качества для разных целей) и ее производные; 2) прочие продукты древесных растений (кора, листья и хвоя, цветки и их части, плоды, семена); 3) естественный защитный фактор и природная среда, благоприятная для жизни, место обитания для многих видов фауны [1].

В связи с этим, всегда остается актуальной проблема сохранения, рационального многоцелевого использования и восстановления древесных насаждений. Особую значимость решению этих вопросов придает также возрастающая антропогенная нагрузка, вследствие чего снижается способность растений противостоять инфицированию фитопатогенами, в том числе и вирусами [2].

Вирусы растений играют значительную негативную роль в лесном хозяйстве. Они, наряду с грибами и бактериями, являются возбудителями инфекционных заболеваний, способны значительно ослабить растение, ухудшить его хозяйственно-ценные признаки [3]. Однако, по сравнению с другими возбудителями инфекционных заболеваний, вирусы растений (особенно древесных видов) изучены слабо.

Вирусоподобные генетические элементы (ВГЭ) представляют собой нуклеотидные последовательности, интегрированные в геномную ДНК растительных клеток и имеющие участки (локусы), гомологичные определенным вирусным генам.

Наиболее распространенным типом ВГЭ в геноме как хвойных, так и растений в целом, являются ретротранспозоны [4, 5], которые, согласно современным представлениям, имеют общего предшественника с ретровирусами [6, 7]. Ретротранспозоны относятся к мобильным генетическим элементам I типа. С эволюционной точки зрения, они появились в результате встраивания вирусной кДНК в геном клетки-хозяина и последующей утраты инфекционных свойств, например, вследствие

мутаций или делеции гена *env* у ретровирусов, кодирующего гликопротеин оболочки, необходимый для инфицирования и проникновения через цитоплазматическую мембрану [8]. Впоследствии могло происходить дальнейшее накопление изменений в нуклеотидной структуре различных локусов. Вместе с тем, вирусоподобные генетические элементы способны автономно реплицироваться, транскрибироваться и встраиваться в геном растения в новых участках по механизму транспозиции [8]. Таким образом, основное отличие ВГЭ от вирусов – неспособность инфицировать другие растения.

Однако, несмотря на утрату инфекционных свойств, вирусоподобные генетические элементы имеют существенное негативное значение для лесного хозяйства, поскольку результатом их транспозиции могут стать различные нарушения структурно-функциональной организации генома: инсерции, приводящие к образованию транскрипционных разрывов в экзонных участках генов растения или увеличению размеров интронов, а также делеции и транслокации. Это является причиной возникновения нежелательных фенотипических эффектов [9]. ВГЭ являются также одной из причин возникновения выраженной инбредной депрессии у хвойных.

В связи с этим, изучение разнообразия вирусоподобных генетических элементов в геноме хвойных представляет определенный интерес.

Материалы и методы

Исходным материалом являлись образцы растительных тканей 40-летних деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и ели европейской (*Picea abies* (L.) N.Karst.), произрастающих на территории ГЛХУ «Гомельский лесхоз». На начальном этапе исследований проводилось выделение суммарной ДНК модифицированным СТАВ-методом и суммарной РНК при помощи набора реагентов GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific). Для последующего создания ДНК-библиотек все образцы РНК были переведены в стабилизированную форму в виде кДНК.

Библиотеки ДНК-фрагментов для последующего секвенирования готовили согласно протоколу фирмы-производителя с использованием набора реактивов Ion Plus Fragment Library

Kit (Ion Torrent – Life Technologies). Шесть библиотек были получены с использованием суммарной ДНК сосны обыкновенной и три – с использованием кДНК, синтезированной на матрице суммарной РНК ели европейской. При подготовке библиотек также использовался набор реагентов Ion Library Equalizer Kit, благодаря чему их ожидаемая концентрация должна составлять ≈ 100 pM.

Качество библиотек фрагментов проверяли с применением методов электрофоретического фракционирования, спектрофотометрии и ПЦР в режиме реального времени (Real-time PCR).

ПЦР проводили на амплификаторе Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies) с использованием готовой смеси Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) и праймеров для амплификации библиотек Library Amplification Primer Mix из набора Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Ion Torrent – Life Technologies). Данные эксперимента были представлены в виде графика зависимости интенсивности флуоресценции от количества прошедших циклов ПЦР, при этом резкое возрастание интенсивности флуоресценции началось с 6–10 цикла, что свидетельствует о достаточной концентрации исходных библиотек.

С целью установления соответствия реального размера полученных библиотек рекомендованному (согласно протоколу E-Gel Size Select Agarose Gels Quick Reference) был проведен электрофоретический анализ. Для него использовался 2%-ный агарозный гель на основе ТВЕ-буфера, а напряженность электрического поля составляла 6 В/см. Гель окрашивался бромистым этидием, оценку данных проводили визуально при помощи УФ-трансиллюминатора. Проведенное электрофоретическое фракционирование выявило отсутствие деградации ДНК в препаратах. Было установлено, что амплифицированные фрагменты библиотек имеют размер более 300, но менее 400 п.н., что соответствует ожидаемому значению, приведенному в протоколе фирмы-производителя (≈ 330 п.н.). Фрагменты размером около 600 п.н., которые также были обнаружены в ходе визуального анализа, являлись конкатемерами, образовавшимися в ходе ПЦР.

Был проведен спектрофотометрический анализ библиотек для секвенирования, который показал, что средняя концентрация получен-

ных препаратов нуклеиновых кислот библиотек находилась в пределах 4,5–7,5 нг/мкл образца. Соотношение экстинкций A_{260}/A_{280} находилось в диапазоне 1,83–2,10, что указывает на высокую степень очистки препаратов ДНК.

Далее готовили матрицу для секвенирования с использованием полученных библиотек. Секвенирование выполнялось на полногеномном анализаторе Ion PGM System (Life Technologies). Все этапы подготовки проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя, с использованием наборов реагентов, поставляемых вместе с оборудованием.

Подготовленные библиотеки использовались в качестве матрицы для эмульсионной ПЦР, которая осуществлялась при помощи специального амплификатора Ion OneTouch 2 System и комплекта реактивов Ion PGM Template OT2 200 Kit (Life Technologies). При эмульсионной ПЦР амплификация происходит внутри капелек водной фазы, эмульгированной в инертном жидком масле. Внутри капельки находится твердофазный носитель сферической формы, имеющий поверхностный заряд и обладающий гидрофильными свойствами (Ion Sphere Particles). На его поверхности также иммобилизованы короткие последовательности ДНК, комплементарные концевым адаптерным участкам библиотек. В идеальном случае количество ДНК-фрагментов библиотек приблизительно равно количеству этих сферических частиц, и на поверхности каждой частицы, окруженной водной фазой, амплифицируется только один фрагмент. Таким образом, получают моноклональные микросферы. Этот этап необходим для иммобилизации фрагментов библиотек и усиления сигнала в ходе последующего секвенирования.

На следующем этапе проводили отмывку микрочастиц, не несущих амплифицированной ДНК (стадия обогащения). Данная операция осуществлялась с использованием системы автоматической пробоподготовки Ion OneTouch ES и наборов реагентов Ion PGM Template OT2 Solutions 200 Kit, Ion PGM Enrichment Beads (Life Technologies).

Секвенирующая реакция протекала на чипе Ion 314 Chip v2. Финальную пробоподготовку и загрузку чипа проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Первичная обработка данных, поступающих от геномного анализатора Ion PGM System, осуществлялась в автоматическом режиме при помощи программного обеспечения Ion Torrent Suite, поставляемого вместе с оборудованием.

Результаты и обсуждение

В результате первичного анализа были получены следующие показатели для различных образцов: плотность загрузки чипа – от 60 до 92%, доля моноклональных микросфер – 70–87%, доля пустых микросфер – 1–5%, а большая часть полученных прочтений (reads) имела длину от 206 до 269 п.н.

Количество полученных в результате секвенирования парноконцевых чтений варьировалось от 695 467 до 923 775. Оценка качества полученных последовательностей, а также удаление из сиквенсов последовательностей праймеров и адаптеров осуществлялись автоматически в ходе постобработки первичных данных программным комплексом Ion Torrent Suite. Из массива данных удалялись последовательности короче 20 п.н., а также с показателем качества $Q < 20$ (т.е. с вероятностью ошибки секвенирования более 1%). Таким образом, для каждого образца было получено 273 181–394 954 высококачественных парноконцевых чтений или 45,3–65,1 млн п.н.

Сборка парноконцевых чтений в протяженные последовательности (контиги) осуществлялась при помощи программы DNASTAR SeqMan NGen 12. Для различных библиотек число полученных контигов составляло от 13 711 до 27 712.

Поиск перспективных последовательностей для дальнейшего анализа проводился путем сопоставления всех контигов с последовательностями базы данных GenBank [10] с использованием программного комплекса BLAST, размещенного на этом сервере [11], при этом поиск осуществлялся по базе данных нуклеотидных последовательностей (nucleotide blast), а в качестве определяющего параметра поиска с целью расширить выборку была выбрана опция «поиск по частичному сходству» (some-what similar sequences (blastn)).

В результате был выявлен 81 контиг – потенциальные кандидаты в вирусы и вирусоподобные генетические элементы.

Предварительно стоит отметить, что ретротранспозоны подразделяются на две группы: элементы, содержащие длинные концевые повторы (long terminal repeat – LTR), и элементы, не содержащие их [12, 13]. Среди последних различают длинные диспергированные повторы (LINE – long interspersed elements) и короткие диспергированные повторы (SINE – short interspersed elements) [14]. В свою очередь, среди всех ретротранспозонов в геномах эукариот наибольшее распространение получили мигрирующие генетические элементы, содержащие длинные концевые повторы.

Проведенный анализ выявил большое количество контигов, имеющих сходство с различными типами мигрирующих генетических элементов. При этом 74 из идентифицированных последовательностей относились к LTR-содержащим ретротранспозонам группы Ty3/gypsy (семейство Metaviridae), а 2 контига – к группе Ty1/copia (Pseudoviridae).

Генетические элементы этих двух групп имеют общий план строения [8]. Они фланкированы прямыми повторами ДНК клетки-хозяина, имеющими размер пять нуклеотидов и образовавшимися в результате интеграции элемента. Эти ретротранспозоны содержат два длинных концевых повтора (LTR), которые, в свою очередь, имеют по краям короткие инвертированные повторы. Между LTR находится внутренний домен генетического элемента, который кодирует вирусный полипротеин и содержит следующие гены: 1) *Gag* – белок субъединицы капсида; 2) *Ap* – аспаратпротеиназа, осуществляющая гидролиз полипротеина на отдельные функциональные белки; 3) *In* – интеграз (фермент, обеспечивающий вставку кДНК-копии в геном хозяина); 4) *Rt* – обратная транскриптаза, синтезирующая кДНК на матрице вирусной РНК; 5) *Rh* – РНКазы H, гидролизует РНК в составе гибридной молекулы РНК-ДНК, что позволяет достроить вторую цепь кДНК.

Помимо этого, в составе ретротранспозонов имеются сайт связывания праймера (PBS) и полипуриновый тракт (PPT), которые отвечают, соответственно, за инициализацию синтеза (-)-цепи и (+)-цепи кДНК.

Различия между LTR-содержащими ретротранспозонами групп Gypsy и Copia заключаются лишь в положении домена *In* по отно-

шению к другим генам. Последовательности доменов у генетических элементов группы Gypsy (в направлении от 5' - к 3'-концу): *Gag*, *Ap*, *Rt*, *Rh*, *In*. Для группы Copia: *Gag*, *Ap*, *In*, *Rt*, *Rh*.

Также было выявлено 5 контигов, относящихся к ретротранспозонам семейства LINE, представляющих собой альтернативную группу мигрирующих генетических элементов, не содержащих в своей нуклеотидной структуре длинные концевые повторы.

Стоит обратить внимание, что наибольшая часть контигов (91%), идентифицированных как участки LTR-ретротранспозонов, относилась к семейству Ty3/Gypsy. Сравнивая результаты данного исследования с уже описанными в литературе, можно заметить, что большая распространенность ретроэлементов группы Ty3/Gypsy по сравнению с группой Ty1/Copia является характерной для хвойных. Таким образом, полученные данные коррелируют с результатами, опубликованными международным научным коллективом по полногеномному секвенированию ели европейской. Согласно этим сведениям, доля в геноме LTR-содержащих ретротранспозонов групп Gypsy и Copia составляет 35% и 16% соответственно, а элементов LINE – 1% [15].

Также следует отметить, что все выявленные последовательности являлись уникальными, что указывает на их самостоятельность. При этом большая часть ретротранспозонов ели европейской содержала последовательности различных генов первичного и вторичного метаболизма: 3-каренинсинтетазы, (-)-энт-кауренинсинтетазы, цитохрома P450 подсемейства CYP720B и др., что может указывать на их определенную роль в формировании адаптивной изменчивости хвойных. К сожалению, в настоящее время нет опубликованных данных других авторов, которые бы подтверждали эту гипотезу. Тем не менее, согласно имеющимся литературным источникам по данной теме, для хвойных характерны очень протяженные интроны и большое число псевдогенов, образовавшиеся в результате инсерций мобильных генетических элементов в гены хвойных в ходе эволюции их генома. Отдельные гены у них также разделены длинными некодирующими последовательностями ДНК, богатыми транспозонами и имеющими низкую частоту

рекомбинации. По мнению авторов, причина вышеописанного явления заключается в том, что молекулярные механизмы элиминации мигрирующих элементов (например, посредством неравной рекомбинации) у хвойных менее активны, чем у большинства других организмов [15]. Таким образом, ретротранспозоны играют существенную роль в организации генома хвойных.

Заключение

Используя метод высокопроизводительного секвенирования на основе полупроводниковой детекции протонов (технология Ion Torrent), было проведено секвенирование ДНК-и кДНК-библиотек ели европейской и сосны обыкновенной. С целью изучения разнообразия вирусоподобных генетических элементов хвойных осуществили поиск и аннотацию последовательностей, имеющих сходство с уже описанными ВГЭ.

В результате была аннотирована 81 последовательность, среди них было выявлено сходство с LTR-содержащими ретротранспозонами групп Ty3/gypsy и Ty1/copia, описанных ранее для ели, а также ретротранспозонами, не содержащими LTR и относящимися к семейству LINE. При этом все выявленные последовательности оказались уникальными, а большая их часть содержала участки различных генов первичного и вторичного метаболизма хвойных, что может косвенно свидетельствовать об их роли в формировании адаптивной изменчивости растений.

Полученные результаты могут представлять интерес для генетики и селекции лесных древесных видов, расширить знания о вирусоподобных генетических элементах хвойных и их значении.

Исследования были выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б15РМ-007).

Список использованных источников

1. Мелехов, И.С. Лесоводство / И.С. Мелехов. – 2-е изд., доп., испр. – М.: МГУЛ, 2003. – 320 с.
2. Федоров, Н.И. Лесная фитопатология: учебник для студентов специальностей «Лес-

ное хозяйство» / Н.И. Федоров. – Минск: БГТУ, 2004. – 462 с.

3. Forest disease caused by viruses / C. Büttner [et al.] // Infectious Forest Disease. – Croydon: CPI Group, 2013. – P. 60–74.

4. Copia-like retrotransposons are ubiquitous among plants / D.F. Voytas [et al.] // PNAS USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 7124–7128.

5. Suoniemi, A. Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom / A. Suoniemi, J. Tanskanen, A.H. Schulman // Plant Journal. – 1998. – Vol. 13. – P. 699–705.

6. Xiong, Y. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences / Y. Xiong, T.H. Eickbush // EMBO Journal. – 1990. – Vol. 9. – P. 3353–3362.

7. Retrovirus phylogeny and evolution / R.F. Doolittle [et al.] // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 1990. – Vol. 157. – P. 1–18.

8. Schulman, A.H. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants / A.H. Schulman, A.J. Flavell, T.H. Noel Ellis // Methods in Molecular Biology. – 2004. – Vol. 260. – P. 145–173.

9. Vandenbussche, M. TE-based Mutagenesis Systems in Plants / M. Vandenbussche, T. Gerats // Methods in Molecular Biology. – 2004. – Vol. 260. – P. 115–127.

10. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. – Date of access: 10.09.2016.

11. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [Electronic resource]. – Mode of access: <http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> – Date of access: 11.09.2016.

12. Grandbastien, M.-A. Retroelements in higher plants / M.-A. Grandbastien // Trends Genet. – 1992. – Vol. 8. – P. 103–108.

13. Bennetzen, J.L. The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution / J.L. Bennetzen // Trends Microbiol. – 1996. – Vol. 4. – P. 347–353.

14. Schmidt, T. LINEs, SINEs and repetitive DNA: non-LTR retrotransposons in plant genomes / T. Schmidt // Plant Mol. Biol. – 1999. – Vol. 40. – P. 903–910.

15. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution / B. Nystedt [et al.] // Nature. – 2013. – Vol. 497. – P. 579–584.

I.E. Rubel¹, O.Yu. Baranov¹, S.V. Panteleev¹, O.A. Razumova¹, V.A. Gushchin², V.V. Makarov²

**RESEARCH OF THE VIRUS-LIKE ELEMENTS IN THE GENOME OF
CONIFERS BASED ON THE NEXT-GENERATION SEQUENCING DATA
(Short report)**

¹The Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus
Gomel BY-246001, Republic of Belarus

²A.N. Belozersky Institute Of Physico-Chemical Biology MSU
Moscow, 119234, Russia

This article describes a variety of virus-like genetic elements of conifers. Data for later analysis and search of the virus-like sequences in the plant genome were obtained by next-generation sequencing based on the semiconductor detection of protons (Ion Torrent technology). A series of sequences with similarity to the previously described virus-like genetic elements was annotated. We have identified the long terminal repeat (LTR)-containing retrotransposons belonging to the Ty3/gypsy and Ty1/copia families, that are ubiquitous throughout the spruce genome, and non-LTR retrotransposons belonging to the LINE family.

Key words: virus-like genetic elements, retrotransposons, next-generation sequencing, conifers.

Дата поступления статьи 29 сентября 2016 г.

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) на русском и английском языках;
- аннотацию на русском и английском языках (рекомендуемый средний объем аннотации – 500 знаков с пробелами). Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи;
- текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки «Введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение»), обзорная статья может содержать подзаголовки: «Введение», «Заключение» и названия подразделов;
- список использованных источников;
- дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10–12 страниц. После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентичного содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на 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.

Рукописи авторства сторонних организаций предоставляются вместе с сопроводительным письмом, в структуре которого должны содержаться сведения о том, что:

- рукопись не находится на рассмотрении в другом издании;
- не была ранее опубликована;
- автор (авторы) несут ответственность за достоверность представленных в рукописи материалов.

Также необходимо представить акт экспертизы о возможности опубликования в открытой печати. Научная статья должна иметь 2 рецензии от специалистов, имеющих ученую степень доктора или кандидата наук.

1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS Word. Название файлов – фамилия первого автора латинскими буквами.
2. Формат бумаги А4 (297×210 мм), ориентация – книжная.
3. Поля: верхнее – 2,5 см, нижнее – 2,5 см, левое – 2,5 см, правое – 2,5 см.
4. Основной текст статьи набирается шрифтом Times New Roman, размером 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.
5. Автоматическая расстановка переносов обязательна. Запрещается ручная расстановка принудительных переносов.
6. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.
7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).

8. Вставка в текст символов (например, β , ϵ) производится только через опцию «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C^2 , C_4) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются курсивом. Математические формулы ($\lim$, $\sum$, $\sin$, и т.д.) и цифры набираются прямым начертанием.

9. Сложные слова набираются через дефис (минерал-индикатор, К-пространство). Тире 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 названы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и какими по порядку рисунками статьи являются. Графики должны иметь толщину всех линий не менее 0,2 пункта для четкого воспроизведения. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, не допускается использование сканированного текста.

12. Фотоматериалы предоставляются в виде отдельных электронных файлов, также необходимы распечатки на лазерном принтере всех иллюстраций на листе формата А4. Отсканированные фотоиллюстрации серой, черно-белой цветовой модели должны иметь разрешение 600 dpi и формат TIFF.

13. Список цитированных источников располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок должны быть написаны внутри квадратных скобок. (напр.: [1]).

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 21

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*
Верстка *Е.А. Бельская*
Корректор *И.В. Широкая*
Технический редактор *Е.А. Бельская*
Переводчик *А.А. Абметко*

Подписано в печать 19.10.2016. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 13,49. Уч.изд. л. 8,51. Тираж 100 экз. Заказ №
Отпечатано в типографии ЧУП «Альтиора».

Оригинал-макет подготовлен в Государственном научном учреждении «Институт генетики
и цитологии Национальной академии наук Беларуси»
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/51 от 08.10.2013 г.
220072, г. Минск, ул. Академическая, 27