

ISSN 1999-9127

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 22**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2017

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, 2017. – Т. 22. – 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

СОДЕРЖАНИЕ

<i>М.Д. Амелянович, П.М. Морозик, А.В. Сикорский, Л.З. Полонецкий, И.Б. Мосса</i> Выявление информативных генетических маркеров предрасположенности к артериальной гипертензии.....	5
<i>Н.В. Савина, Н.В. Никитченко, Т.Д. Кужур, Е.В. Сечко, А.М. Чичко, А.В. Сукало, Р.И. Гончарова</i> Частоты генотипов и аллелей полиморфных локусов генов воспалительного ответа <i>PTPN22</i> , <i>TNFA</i> и <i>MIF</i> у детского контингента Республики Беларусь.....	14
<i>С.А. Котова, Е.А. Заблоцкая, Е.А. Спивак, В.И. Рыбакова, Д.Э. Недзвецкая, И.С. Цыбовский</i> Перекрестная амплификация микросателлитных ДНК-маркеров в исследовании полиморфизма видов отряда <i>Artiodactyla</i> (Парнокопытные).....	25
<i>Р.А. Кулибаба, Ю.В. Ляшенко</i> К вопросу об образовании конформационных химерных молекул в процессе амплификации динуклеотидных tandemных повторов.....	34
<i>М.С. Родькин, О.Д. Левданский, В.С. Панкратов, Д.Е. Данилов</i> Полиморфные локусы ss469415590 гена <i>IFNL4</i> и rs12979860 гена <i>IL-28B</i> в роли генетических предикторов эффективности терапии белорусских пациентов с хроническим вирусным гепатитом С.....	43
<i>В.Д. Федына, Д.И. Литвин, А.И. Емец, Я.Б. Блюм</i> Реализация индуцированной стрессовыми факторами аутофагии у растений с участием микротрубочек (обзорная статья).....	52
<i>Е.В. Воронкова, В.И. Лукаша, О.Н. Гукасян, Ю.В. Полюхович, В.М. Жарич, А.П. Ермишин</i> Использование митотической полиплоидизации <i>in vitro</i> для создания мультиплексных родительских линий картофеля.....	62
<i>А.М. Шишлова-Соколовская, О.Ю. Урбанович, И.В. Федосеева, Г.Б. Боровский</i> Трансформация <i>Nicotiana tabacum</i> конструкцией, несущей ген <i>NDB2</i> из <i>Arabidopsis thaliana</i> в антисмысловой ориентации.....	76
<i>В.Е. Шимко, И.А. Гордей</i> Особенности проявления генетической совместимости мужски стерильных и самофертильных линий при формировании гибридов F ₁ озимой ржи.....	84
<i>С.М. Сичкарь, Л.Г. Великожон, О.В. Дубровная</i> Молекулярно-генетический анализ и хлебопекарные качества гибридов <i>Triticum spelta</i> L. × <i>Triticum aestivum</i> L.	96
<i>О.А. Межнина, О.Ю. Урбанович</i> Идентификация сортов смородины черной (<i>Ribes nigrum</i>) и выявление генов хозяйственно-ценных признаков с помощью технологии молекулярных маркеров.....	104
Правила оформления статьи.....	111

CONTENTS

<i>M.D. Ameliyanovich, P.M. Marozik, A.V. Sikorski, L.Z. Polonetsky, I.B. Mosse</i> Identification of Informative Genetic Markers for the Predisposition to Arterial Hypertension....	5
<i>N.V. Savina, N.V. Nikitchenko, T.D. Kuzhir, E.V. Sechko, A.M. Chichko, A.V. Sukalo, R.I. Goncharova</i> Frequencies of Genotypes and Alleles of Polymorphic Loci of Inflammatory Response Genes <i>PTPN22</i> , <i>TNFα</i> and <i>MIF</i> in Children and Adolescents in the Republic of Belarus.....	14
<i>S.A. Kotova, A.A. Zablotzkaya, E.A. Spivak, V.I. Rybakova, D.E. Nedzvedskaya, I.S. Tsybovsky</i> Cross-Amplification of Microsatellite DNA-markers in Species Polymorphism Investigations of the Order <i>Artiodactyla</i>	25
<i>R.A. Kulibaba, Y.V. Liashenko</i> On the Issue of Generation of Conformational Chimeric Molecules During Amplification of Dinucleotide Tandem Repeats.....	34
<i>M.S. Rodzkin, A.D. Liaudanski, V.S. Pankratov, D.Ye. Danilau</i> Polymorphic Loci ss469415590 of <i>IFNL4</i> Gene and rs12979860 of <i>IL-28B</i> Gene as Genetic Predictors of Treatment Outcome in Belarusian Patients with Chronic Hepatitis C.....	43
<i>V.D. Fedyna, D.I. Lytvyn, A.I. Yemets, Ya.B. Blume</i> Realisation of Stress-Induced Autophagy in Plants with Participation of Microtubules (Review)	52
<i>E.V. Voronkova, V.I. Luksha, O.N. Gukasian, Yu.V. Polyukhovich, M.V. Zharych, A.P. Yermishin</i> Use of Mitotic Polyploidization <i>In Vitro</i> for Production of Potato Multiplex Parental Lines.....	62
<i>A.M. Shishlova-Sokolovskaya, O.Yu. Urbanovich, I.V. Fedoseyeva, G.B. Borovsky</i> Transformation of <i>Nicotiana Tabacum</i> by the Construction that Carries <i>NDB2</i> Gene of <i>Arabidopsis Thaliana</i> in the Antisense Orientation	76
<i>V.E. Shymko, I.A. Gordei</i> Peculiarities of Genetic Compatibility in Male-Sterile and Self-Fertile Lines in F ₁ Hybrids' Formation of Winter Rye	84
<i>S.M. Sichkar, L.H. Velykozhon, O.V. Dubrovna</i> Molecular Genetic Analysis and Baking Properties of Hybrids <i>Triticum Spelta</i> L. \times <i>Triticum Aestivum</i> L.	96
<i>O.A. Mezhnina, O.Yu. Urbanovich</i> Identification of Black Currant Cultivars (<i>Ribes Nigrum</i>) and the Detection of Genes Associated with Agronomic Valuable Traits Using the Molecular Markers Technology.....	104
Instructions to Authors.....	111

М.Д. Амелянович¹, П.М. Морозик¹, А.В. Сикорский², Л.З. Полонецкий³, И.Б. Моссе¹

ВЫЯВЛЕНИЕ ИНФОРМАТИВНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

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

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

³РНПЦ «Кардиология»
220036, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Р. Люксембург, 110

Проанализированы частоты встречаемости полиморфных вариантов девяти генов, участвующих в регуляции уровня артериального давления, углеводного обмена, роста эндотелия сосудов, а также факторов тромбообразования, и изучено их влияние на риск развития артериальной гипертензии (АГ). Определены наиболее информативные маркеры риска развития АГ (*UCP2 Ala/Val*, *TCF7L2 C/T*, *BDKRB2 I/D*). Сравнительный анализ выявил различия в частотах генотипов полиморфных вариантов генов *ACE* и *PPARG* в группах пациентов с АГ и первичной артериальной гипотензией.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, гипотензия, генетическая предрасположенность, полиморфизм, факторы риска.

Введение

Артериальная гипертензия (АГ) является неотъемлемым компонентом кардио-метаболических нарушений у человека. На взаимосвязь АГ и ожирения ученые обратили внимание еще в начале прошлого века [1, 2]. Повышенный риск развития осложнений у больных вызывает сочетание артериальной гипертензии с одним из составляющих метаболического синдрома – абдоминальным ожирением, нарушением углеводного обмена или сахарным диабетом 2-го типа. Сочетание АГ с сахарным диабетом многократно увеличивает вероятность развития ишемической болезни сердца, сердечной недостаточности и заболеваний сосудов.

Некоторые исследователи считают АГ первым этапом развития у пациентов метаболического синдрома. В то же время в большинстве случаев невозможно точно определить, какое заболевание является первичным, ввиду общности патофизиологических механизмов развития АГ и инсулинорезистентности. Артериальная гипертензия вызывает ухудшение периферического кровообращения, что приводит к снижению чувствительности тканей к инсулину, к относительной гиперин-

сулинемии и, в конечном итоге, к инсулинорезистентности. С другой стороны инсулинорезистентность способствует развитию АГ преимущественно через активацию симпатoadреналовой системы, а увеличение фильтрации глюкозы клубочками почек приводит к усилению обратного всасывания глюкозы вместе с натрием в проксимальных канальцах нефрона. Это приводит к гипертонии и увеличению содержания натрия и кальция в стенках сосудов, вызывая спазм последних и повышение общего периферического сосудистого сопротивления [3].

В данной работе мы проанализировали влияние на риск развития артериальной гипертензии не только полиморфных вариантов генов, непосредственно участвующих в регуляции уровня артериального давления, но и участвующих в регуляции углеводного обмена, роста эндотелия сосудов, а также факторов свертывания крови.

Материалы и методы

Для оценки влияния исследуемых полиморфных вариантов генов на уровень артериального давления были сформированы следующие группы:

1. Группа лиц с артериальной гипертензией (101 человек);

2. Группа лиц с первичной артериальной гипотензией (34 человека);

3. Случайная выборка доноров крови в качестве контрольной группы (360 человек).

Для выделения ДНК из клеток буккального эпителия или лейкоцитов периферической крови использовалась классическая методика фенол-хлороформной экстракции[4]. Данная методика обладает хорошей воспроизводимостью,

способна обеспечить высокую степень чистоты ДНК, полученные этим методом препараты стабильны и могут храниться длительное время.

Исследования проводились с использованием амплификатора Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США), а также системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени CFX96 (Bio-Rad, США). Температурно-временные условия проведения ПЦР подбирали экспериментально, программы амплификации представлены в табл. 1.

Таблица 1

Температурно-временные условия проведения ПЦР

Ген	Полиморфизм	Программа амплификации
<i>ACE</i>	<i>I/D</i>	95 °C – 5 мин, [95 °C – 45 с, 59 °C – 30 с, 72 °C – 45 с] x32 цикла, 72 °C – 2 мин
<i>BDKRB2</i>	<i>I/D (+9/-9)</i>	95 °C – 5 мин, [95 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с] x30 циклов, 72 °C – 5 мин
<i>ENOS</i>	<i>Glu298Asp (G/T)</i>	95 °C – 15 мин, [99 °C – 1 с, 65 °C – 20 с, 72 °C – 30 с] x30 циклов, 72 °C – 2 мин
<i>PPARG</i>	<i>Pro12Ala</i>	95 °C – 5 мин, [95 °C – 30 с, 57 °C – 20 с, 72 °C – 20 с] x30 циклов, 72 °C – 2 мин
<i>TCF7L2</i>	<i>C/T</i>	95 °C – 15 мин, [99 °C – 1 с, 58 °C – 15 с, 72 °C – 20 с] x31 цикл, 72 °C – 1 мин
<i>UCP2</i>	<i>Ala55Val</i>	95 °C – 5 мин, [95 °C – 15 с, 64 °C – 60 с] x30 циклов
<i>MB</i>	<i>G/A</i>	95 °C – 10 мин, [95 °C – 20 с, 63 °C – 30 с] x40 циклов
<i>F2+F5</i>	<i>G/A</i>	95 °C – 10 мин, [95 °C – 20 с, 63 °C – 30 с] x40 циклов

Для определения генотипа по полиморфным вариантам генов *ACE*, *BDKRB2* использовали двухпраймерную систему. Для генотипирования образцов по генам *NOS3*, *PPARG*, *TCF7L2*, *MB* использовали методику на основе Tetra-primer ARMS PCR, с использованием отдельных стандартных компонентов реакционной смеси и аллель-специфичных праймеров. Идентификацию полиморфизма гена *UCP2* проводили с помощью Real-time PCR. Для выявления мутации *G20210A* и мутации *FVL* использована разработанная в лаборатории методика на основе Multiplex Real-time PCR, которая позволяет определять генотип образца одновременно по двум мутациям.

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием стандартного пакета программы STATISTICA 10 для Windows (StatSoft Inc., USA).

Для статистического анализа распределения частот генотипов в исследованных группах использован критерий χ^2 Пирсона, для редких генотипов расчет проводился с учетом поправки Йетса. Распределение соответствующих генотипов в исследуемых группах для всех проанализированных полиморфизмов соответствовало ожидаемому распределению Харди-Вайнберга.

Оценку влияния полиморфизмов на риск развития заболевания проводили с помощью отношения шансов (OR) с учетом 95% доверительного интервала (95% CI).

Результаты анализа считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты молекулярно-генетического тестирования по отобраным полиморфным вариантам генов, проведенного в группе лиц с АГ и в контрольной группе, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты генотипирования группы лиц с гипертензией и контрольной группы по анализируемым генам

Ген, полиморфизм	Генотипы, аллели	Частота, %		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)
		АГ, n = 101	Контроль, n = 360			
<i>ACE</i> <i>I/D</i>	<i>D/D</i>	29,7	25,8	3,02	0,22	1,21 (0,74–1,98)
	<i>I/D</i>	54,5	50,3			1,18 (0,76–1,84)
	<i>I/I</i>	15,8	23,9			0,60 (0,33–1,08)
	<i>D</i>	56,9	51,0	2,24	0,13	1,27 (0,93–1,74)
	<i>I</i>	43,1	49,0			0,79 (0,57–1,08)
<i>ENOS</i> <i>G/T</i>	<i>G/G</i>	53,5	50,8	1,48	0,48	1,11 (0,71–1,73)
	<i>G/T</i>	41,5	40,6			1,04 (0,67–1,63)
	<i>T/T</i>	5,0	8,6			0,55 (0,21–1,46)
	<i>G</i>	74,3	71,1	0,77	0,38	1,17 (0,82–1,67)
	<i>T</i>	25,7	28,9			0,85 (0,60–1,22)
<i>UCP2</i> <i>Ala55Val</i>	<i>Ala/Ala</i>	39,6	26,1	6,98	0,03	1,86 (1,17–2,95)
	<i>Ala/Val</i>	43,6	53,9			0,66 (0,42–1,03)
	<i>Val/Val</i>	16,8	20,0			0,81 (0,45–1,45)
	<i>Ala</i>	61,4	53,1	4,42	0,04	1,41 (1,02–1,93)
	<i>Val</i>	38,6	46,9			0,71 (0,52–0,98)
<i>MB</i> <i>A/G</i>	<i>A/A</i>	24,8	21,9	0,46	0,79	1,17 (0,70–1,96)
	<i>G/A</i>	54,5	55,0			0,98 (0,63–1,52)
	<i>G/G</i>	20,7	23,1			0,88 (0,51–1,50)
	<i>A</i>	52,0	49,4	0,41	0,52	1,11 (0,81–1,51)
	<i>G</i>	48,0	50,6			0,90 (0,66–1,23)
<i>BDKRB2</i> <i>I/D</i>	<i>D/D</i>	13,9	22,8	4,70	0,1	0,55 (0,29–1,01)
	<i>I/D</i>	49,5	48,6			1,04 (0,67–1,61)
	<i>I/I</i>	36,6	28,6			1,44 (0,91–2,30)
	<i>D</i>	38,6	47,1	4,57	0,03	0,71 (0,51–0,97)
	<i>I</i>	61,4	52,9			1,41 (1,03–1,95)
<i>TCF7L2</i> <i>C/T</i>	<i>C/C</i>	46,6	66,7	13,64	0,001	0,44 (0,28–0,68)
	<i>C/T</i>	45,5	28,0			2,14 (1,36–3,38)
	<i>T/T</i>	7,9	5,3			1,54 (0,66–3,64)
	<i>C</i>	69,3	80,7	12,00	0,0005	0,54 (0,38–0,77)
	<i>T</i>	30,7	19,3			1,85 (1,30–2,63)
<i>PPARG</i> <i>Pro12Ala</i>	<i>Pro/Pro</i>	79,2	74,1	1,16	0,56	1,33 (0,78–2,27)
	<i>Pro/Ala</i>	18,8	22,8			0,79 (0,45–1,37)
	<i>Ala/Ala</i>	2,0	3,1			0,64 (0,14–2,94)
	<i>Pro</i>	88,6	85,6	1,24	0,27	1,31 (0,81–2,13)
	<i>Ala</i>	11,4	14,4			0,76 (0,47–1,23)
<i>FII</i> <i>G20210A</i>	<i>G/G</i>	96,0	97,5	0,61	0,74	0,62 (0,19–2,06)
	<i>G/A</i>	4,0	2,5			1,61 (0,48–5,33)
	<i>A/A</i>	–	–			–
	<i>G</i>	98,0	98,7	0,61	0,44	0,63 (0,19–2,06)
	<i>A</i>	2,0	1,3			1,60 (0,49–5,24)

Продолжение табл. 2

Ген, полиморфизм	Генотипы, аллели	Частота, %		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)
		АГ, n = 101	Контроль, n = 360			
<i>FV</i> <i>FVL</i>	<i>G/G</i>	97,0	96,1	0,19	0,91	1,32 (0,37–4,69)
	<i>G/A</i>	3,0	3,9			0,76 (0,21–2,69)
	<i>A/A</i>	–	–			–
	<i>G</i>	98,5	98,1	0,18	0,67	1,32 (0,37–4,62)
	<i>A</i>	1,5	1,9			0,76 (0,22–2,67)

Наибольшие различия в распределении частот генотипов и аллелей в исследованных группах наблюдаются по полиморфизму *C/T* гена *TCF7L2* ($\chi^2 = 13,64$ и $\chi^2 = 12,00$ соответственно, $p < 0,01$). Частота генотипа *C/T* в группе лиц с АГ значительно выше, чем в контрольной группе (45,5% и 28,0% соответственно). Частота встречаемости аллеля *T* в группе лиц с АГ составила 30,7%, что достоверно превышает данный показатель в контрольной группе. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие генотипа *C/T* полиморфизма *C/T* гена *TCF7L2* существенно повышает риск развития АГ (OR = 2,14 95% CI 1,36–3,38).

Наблюдаемая в нашем исследовании частота редкого генотипа *T/T* (5,9%) в контрольной группе соответствует частоте встречаемости данного генотипа в европейских популяциях, описанных в литературных источниках [5].

Приведенные данные свидетельствуют о вкладе полиморфизма *C/T* гена *TCF7L2* в патогенез развития артериальной гипертензии, поэтому выявление данного полиморфизма может служить важным диагностическим критерием при определении риска развития данного заболевания.

Ген *TCF7L2* кодирует транскрипционный фактор, который является составной частью сигнального пути *Wnt*. Данный сигнальный путь задействован в регуляции механизмов роста, развития и функционирования различных клеток, в том числе и β -клеток поджелудочной железы [6]. Связь полиморфизма *C/T* гена *TCF7L2* с риском развития инсулин-резистентности и сахарного диабета 2-го типа подтверждена многими исследователями, однако имеются противоречивые данные о его ассоциации с сердечно-сосудистыми заболеваниями [7].

Статистически значимые различия между распределением частот генотипов в группе лиц с АГ и в контрольной группе также были получены при анализе результатов генотипирования образцов по полиморфизму *Ala/Val* гена *UCP2* ($\chi^2 = 6,98$, $p < 0,05$). Генотип *Ala/Ala* чаще встречается в группе лиц с АГ по сравнению с контрольной группой (39,6% и 26,1% соответственно), что свидетельствует о повышении риска развития данного заболевания у его носителей (OR = 1,86 95% CI 1,17–2,95). Аллель *Val*, наоборот, встречается чаще в контрольной группе (OR = 0,71 95% CI 0,52–0,98).

Полученная нами частота аллеля *Val* в контрольной группе (46,9%) несколько отличается от описанного [8] для европейской популяции уровня в 42%, однако исследования зачастую противоречивы, а на больших выборках редки. Физиологические функции белков семейства *UCP* остаются до конца неизученными, однако считается, что *UCP2*, благодаря своей активности, играет важную роль в патофизиологии диабета 2-го типа. Также имеются сведения о влиянии *UCP2* на солевой обмен в организме, что, в конечном счете, может приводить к нарушению регуляции артериального давления [9].

Различия в распределении частот генотипов по полиморфизму *I/D* гена *ACE* в исследованных группах не достигли необходимого уровня статистической значимости ($\chi^2 = 3,02$, $p > 0,05$), однако генотип *I/I*, который связан со сниженной продукцией ангиотензинпревращающего фермента в организме, в контрольной группе встречается в 1,5 раза чаще, чем в группе лиц с АГ (23,9% и 15,8% соответственно). Выявленная в данном исследовании частота аллелей в контрольной группе сопоставима с описанной в литературе для белорусской популяции [10].

Частота встречаемости аллеля *I* полиморфизма *I/D* гена *BDKRB2* в группе лиц с АГ статистически значимо отличалась от таковой в контрольной группе ($\chi^2 = 4,57, p < 0,05$). Считается, что носительство *I*-аллеля сопряжено с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний. Брадикинин наравне с оксидом азота NO является важным регулятором артериального давления в организме, за счет выраженного сосудорасширяющего действия. Взаимосвязь полиморфизма *I/D* гена рецептора брадикинина *BDKRB2* с уровнем артериального давления была показана во многих зарубежных исследованиях [11].

При анализе распределения частот генотипов и аллелей полиморфизма *G/T* гена *ENOS* в протестированных группах значимых различий обнаружено не было. Описанная в литературе частота встречаемости генотипа *T/T* варьируется от 6,1% в Италии до 11,3% в Великобритании [12], что вполне согласуется с нашими результатами генотипирования контрольной группы.

Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов генов *MB*, *FII*, *FV* в группе лиц с АГ и в контрольной группе практически не различались. По-видимому, данные полиморфизмы не оказы-

вают существенного влияния на уровень артериального давления, однако могут участвовать в кумуляции эффектов других полиморфизмов.

Результаты сравнения распределения частот генотипов и аллелей исследованных полиморфизмов в группе лиц с артериальной гипертензией и группе лиц с первичной артериальной гипотензией (ПАГ) представлены в табл. 3.

Наибольшие различия между анализируемыми группами наблюдались по полиморфизму *I/D* гена *ACE*. Так, генотип *I/I* в группе лиц с ПАГ встречался в 2,4 раза чаще, чем в группе лиц с АГ (38,2% и 15,8% соответственно). Учитывая то, что частота генотипа *I/I* в контрольной группе составила 23,9%, можно сделать вывод, что в данном исследовании подтверждено влияние полиморфизма *I/D* гена *ACE* на уровень артериального давления. Взаимосвязь данного полиморфизма с уровнем артериального давления была показана и зарубежными исследователями [13]. В этих работах показано, что уровень циркулирующего в крови ангиотензин-превращающего фермента у носителей генотипа *D/D* был в 2 раза выше, чем у *I/I*-индивидуумов, а у *I/D*-индивидуумов был промежуточный уровень фермента.

Таблица 3

Результаты генотипирования группы лиц с артериальной гипертензией и группы лиц с первичной артериальной гипотензией

Ген, полиморфизм	Генотипы, аллели	Частота %		χ^2	<i>p</i>
		ПАГ, n = 34	АГ, n = 101		
<i>ACE</i> <i>I/D</i>	<i>D/D</i>	23,5	29,7	7,61	0,02
	<i>I/D</i>	38,3	54,5		
	<i>I/I</i>	38,2	15,8		
	<i>D</i>	42,6	56,9	4,17	0,04
	<i>I</i>	57,4	43,1		
<i>ENOS</i> <i>G/T</i>	<i>G/G</i>	64,7	53,5	1,35	0,51
	<i>G/T</i>	32,4	41,5		
	<i>T/T</i>	2,9	5,0		
	<i>G</i>	80,9	74,3	1,22	0,27
	<i>T</i>	19,1	25,7		
<i>UCP2</i> <i>Ala/Val</i>	<i>Ala/Ala</i>	26,5	39,6	3,22	0,2
	<i>Ala/Val</i>	44,1	43,6		
	<i>Val/Val</i>	29,4	16,8		
	<i>Ala</i>	48,5	61,4	3,46	0,06
	<i>Val</i>	51,5	38,6		

Продолжение табл. 3

Ген, полиморфизм	Генотипы, аллели	Частота %		χ^2	<i>p</i>
		ПАГ, n = 34	АГ, n = 101		
<i>MB</i> <i>A/G</i>	<i>A/A</i>	20,6	24,8	1,14	0,56
	<i>G/A</i>	64,7	54,5		
	<i>G/G</i>	14,7	20,7		
	<i>A</i>	52,9	52,0	0,02	0,89
	<i>G</i>	47,1	48,0		
<i>BDKRB2</i> <i>I/D</i>	<i>D/D</i>	11,8	13,9	0,16	0,92
	<i>I/D</i>	52,9	49,5		
	<i>I/I</i>	35,3	36,6		
	<i>D</i>	38,2	38,6	0,00	0,96
	<i>I</i>	61,8	61,4		
<i>TCF</i> <i>C/T</i>	<i>C/C</i>	64,7	46,6	3,38	0,18
	<i>C/T</i>	29,4	45,5		
	<i>T/T</i>	5,9	7,9		
	<i>C</i>	79,4	69,3	2,57	0,11
	<i>T</i>	20,6	30,7		
<i>PPARG</i> <i>Pro12Ala</i>	<i>Pro/Pro</i>	70,6	79,2	1,84	0,4
	<i>Pro/Ala</i>	23,5	18,8		
	<i>Ala/Ala</i>	5,9	2,0		
	<i>Pro</i>	82,4	88,6	1,77	0,18
	<i>Ala</i>	17,6	11,4		

Статистически значимых различий между группами лиц с АГ и ПАГ по остальным протестированным полиморфизмам обнаружено не было. Возможно, это является следствием недостаточного количества протестированных образцов в группе лиц с ПАГ. В то же время при анализе распределения частот генотипов и аллелей по полиморфизму *Ala/Val* гена *UCP2*

наблюдается тенденция к снижению частоты аллеля *Val* и генотипа *Val/Val* при переходе от группы лиц с АГ к группе с ПАГ. Так, наибольшая частота генотипа *Val/Val* наблюдалась в группе лиц с ПАГ (29,4%), в контрольной группе – 20,0%, а в группе лиц с АГ – 16,8%, что в 1,75 раза ниже, чем в группе с первичной гипотензией (рис. 1).

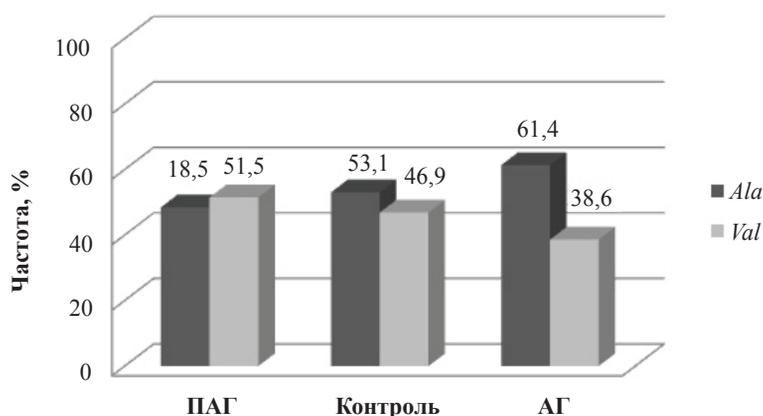


Рис. 1. Распределение частот аллелей полиморфизма *Ala55Val* гена *UCP2* в исследованных группах

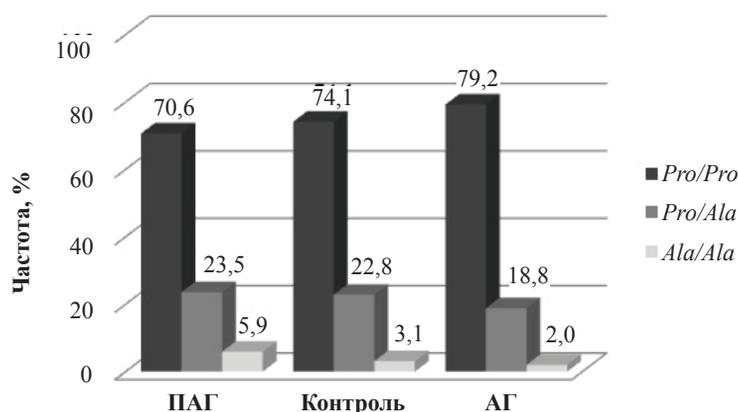


Рис. 2. Распределение частот генотипов полиморфизма *Pro12Ala* гена *PPARG* в исследованных группах

Схожая тенденция наблюдается и по полиморфизму *Pro/Ala* гена *PPARG* (рис. 2). Наибольшая частота минорного аллеля *Ala* наблюдается в группе лиц с ПАГ (17,6%), гетерозиготные и гомозиготные носители данного аллеля также чаще встречаются в данной группе. Частота гомозигот *Ala/Ala* в группе лиц с АГ в 2,95 раз ниже по сравнению с группой лиц с ПАГ (2,0% и 5,9% соответственно).

Проведенный Gouda H.N. et al. мета-анализ, включающий исследования более чем 30 000 человек, показал протективный эффект наличия *Ala*-аллеля гена *PPARG* в генотипе. Этот эффект включал не только предупреждение развития сахарного диабета 2-го типа, но и большую чувствительность к инсулину, то есть предупреждение развития инсулин-резистентности, что особенно проявлялось у лиц с ожирением [14]. В то же время имеются данные о более высоком артериальном давлении у людей, страдающих ожирением и сахарным диабетом – носителей генотипа *Ala/Ala*, по сравнению с носителями генотипа *Pro/Pro*. Влияние полиморфизма *Pro/Ala* гена *PPARG* на уровень артериального давления требует дальнейшего изучения.

Заключение

Проведено исследование влияния полиморфных вариантов 9 генов, участвующих в регуляции уровня артериального давления, углеводного обмена, роста эндотелия сосудов, а также факторов свертываемости крови, на риск развития артериальной гипертензии.

Сравнение генотипов 101 пациента с артериальной гипертензией и контрольной группы случайной выборки 360 доноров крови позволило выявить наиболее информативные маркеры риска развития АГ – это генотип *Ala/Ala* полиморфного варианта *Ala55Val* гена *UCP2*, генотипы *C/T* и *T/T* полиморфного варианта *C/T* гена *TCF7L2*, а также аллель *I* гена *BDKRB2*.

При сравнении распределения генотипов исследуемых полиморфных вариантов в группах лиц с артериальной гипертензией и первичной артериальной гипотензией показано, что генотип *I/I* полиморфизма *I/D* гена *ACE* в группе лиц с ПАГ встречался в 2,4 раза чаще, чем в группе лиц с АГ (38,2% и 15,8% соответственно). Кроме того, при анализе распределения частот генотипов и аллелей по полиморфизму *Pro/Ala* гена *PPARG* наблюдается тенденция к увеличению частоты аллеля *Ala* и генотипа *Ala/Ala* при сравнении группы лиц с АГ, контрольной группы и группы лиц с ПАГ. Так наибольшая частота генотипа *Ala/Ala* наблюдалась в группе лиц с ПАГ (5,9%), в контрольной группе – 3,1%, а в группе лиц с АГ – 2,0%. Необходимо проведение дальнейших исследований для подтверждения наблюдаемой тенденции.

Выявление носительства данных полиморфных вариантов можно использовать для определения групп риска развития артериальной гипертензии, поскольку профилактика и своевременная коррекция эффектов неблагоприятных вариантов генов с помощью соответствующей терапии позволит избежать развития осложнений.

Список использованных источников

1. Parikh, R. Changing definitions of metabolic syndrome / R. Parikh, V. Mohan // *Indian J. Endocrinol. Metab.* – 2012. – Vol. 16, № 1. – P. 7-12.
2. Oda, E. Metabolic syndrome: its history, mechanisms, and limitations / E. Oda // *Acta Diabetol.* – 2011. – Vol. 6, №3. – P. 75-82.
3. Роль инсулинорезистентности в патогенезе артериальной гипертензии / В.Б. Симоненко [и др.] // *Клиническая медицина.* – 2014. – Т. 92, № 9. – С. 27–33.
4. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 399 с.
5. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis / Y. Tong [et al.] // *BMC Medical Genetics.* – 2009. – Vol. 10. – P. 15.
6. Schinner, S. Wnt-signalling and the metabolic syndrome / S. Schinner // *Hormone and Metabolic Research.* – 2009. – Vol. 41, № 2. – P. 159–163.
7. Association between genetics of diabetes, coronary artery disease, and macrovascular complications: exploring a common ground hypothesis / A.G. Sousa [et al.] // *Rev. Diabet Stud.* – 2011. – Vol. 8, № 2. – P. 230–244.
8. Association of the UCP polymorphisms with susceptibility to obesity: case-control study and meta-analysis / L.A. Brondani [et al.] // *Molecular Biology Reports.* – 2014. – Vol. 41, № 8. – P. 5053–5067.
9. Lombard, J.H. Uncoupling Protein 2 (UCP2): Another Player in the Complex Drama of Vascular Salt Sensitivity / J.H. Lombard // *Am. J. Hypertens.* – 2010. – Vol. 23, № 8. – P. 816.
10. Полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы в шести этногеографических регионах беларуси / Л.Н. Сивицкая [и др.] // *Генетика.* – 2008. – Т. 44, № 5. – С. 702–709.
11. Relationship of bradykinin B2 receptor gene polymorphism with essential hypertension and left ventricular hypertrophy / Y. Fu [et al.] // *Hypertens. Res.* – 2004. – Vol. 27, № 12. – P. 933–938.
12. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects / J.P. Casas [et al.] // *Circulation.* – 2004. – Vol. 109, № 11. – P. 1359–1365.
13. Effects of ACE I/D and AT1R-A1166C polymorphisms on blood pressure in a healthy normotensive primary care population: first results of the Hippocrates study / L.H. Henskens [et al.] // *J. Hypertens.* – 2003. – Vol. 21, № 1. – P. 81–86.
14. The association between the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis / H.N. Gouda [et al.] // *Am J Epidemiol.* – 2010. – Vol. 171, № 6. – P. 645–655.

M.D. Ameliyanovich¹, P.M. Marozik¹, A.V. Sikorski², L.Z. Polonetsky³, I.B. Mosse¹

IDENTIFICATION OF INFORMATIVE GENETIC MARKERS FOR THE PREDISPOSITION TO ARTERIAL HYPERTENSION

¹Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus

Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University

Minsk BY-220116, the Republic of Belarus

³RSPC «Cardiology»

Minsk, BY-220036, the Republic of Belarus

The frequency analysis of nine gene polymorphisms involved in the regulation of blood pressure, glucose metabolism, vascular endothelial growth and thrombosis, and their effect on the arterial hypertension risk was performed. The most informative markers of the hypertension risk (*UCP2 Ala/Val*, *TCF7L2 C/T*, *BDKRB2 I/D*) were identified. The comparative analysis revealed differences in the genotype frequencies of *ACE* and *PPARG* gene polymorphisms in patients with arterial hypertension and primary arterial hypotension.

Key words: arterial hypertension, hypotension, genetic predisposition, polymorphism, risk factors

Дата поступления статьи 4 января 2017 г.

Н.В. Савина¹, Н.В. Никитченко¹, Т.Д. Кужир¹, Е.В. Сечко², А.М. Чичко², А.В. Сукало²,
Р.И. Гончарова¹

ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА *PTPN22*, *TNF α* И *MIF* У ДЕТСКОГО КОНТИНГЕНТА РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: N.Savina@igc.by

²УО «Белорусский государственный медицинский университет»

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

Представлены результаты генотипирования образцов ДНК, полученных от 162-х лиц детского и подросткового возраста без аутоиммунных заболеваний по полиморфизму некоторых генов воспалительного ответа *PTPN22* C1858T, *MIF* -173G>C, *TNF α* -238G>A и -308G>A. Популяционные частоты генотипов / аллелей по указанным локусам в нашем исследовании полностью соответствуют характеру их распределения у европеоидного населения и могут быть использованы в качестве контрольных показателей при выявлении молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к развитию аутоиммунных заболеваний. Выявлены гендерные различия в распределении гетерозиготного генотипа C1858T гена *PTPN22* в группе детей и подростков без аутоиммунной патологии: частота встречаемости этого генотипа у девочек почти в 2 раза превышала его частоту у мальчиков ($p = 0,053$). Также показано, что среди мальчиков чаще встречаются носители комбинированного генотипа, сочетающего гомозиготные мажорные аллели трех изученных генов $CC_{PTPN22}-GG_{TNF\alpha}-GC_{MIF}$ (42% против 28% у девочек, $p = 0,07$). Выявленные тенденции могут внести определенный вклад в понимание гендер-специфичности ряда аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, гены воспалительного ответа, полиморфные локусы -308G>A, -238G>A гена *TNF α* , -173G>C гена *MIF*, C1858T гена *PTPN22*.

Введение

Среди болезней человека насчитывают более 100 нозологических форм с аутоиммунным (иммуновоспалительным) патогенезом. Аутоиммунные заболевания (АИЗ) относятся к числу наиболее тяжелых болезней человека, их частота в популяции приближается к 10%. Проблема подобных заболеваний относительно молода – ее возраст около 50 лет, однако за этот срок она стала одной из самых сложных и актуальных для клинической медицины. Наиболее часто встречающимися среди АИЗ как взрослых, так и детей, являются аутоиммунные ревматические болезни, в первую очередь ревматоидный артрит (РА), ювенильные идиопатические артриты (ЮИА), спондилоартриты (СпА), системная красная волчанка (СКВ) и другие системные заболевания соединительной ткани [1].

Поскольку в основе патогенеза любого аутоиммунного заболевания лежат нарушения механизмов регуляции иммунной системы, то

гены, кодирующие ее основные звенья, рассматриваются как потенциальные гены-кандидаты предрасположенности к АИЗ. Среди генетических систем, вносящих свой вклад в развитие подобной патологии, около 40% приходится на комплекс генов главного комплекса гистосовместимости / человеческого лейкоцитарного антигена (*MHC*, *major histocompatibility complex* / *HLA*, *Human Leucocyte Antigen*). В то же время в качестве генов-кандидатов предрасположенности к АИЗ изучаются более 100 “*non-HLA*”-генов [2].

Нами начато исследование молекулярно-генетических основ ряда аутоиммунных заболеваний на выборке белорусских пациентов. Цель работы на данном этапе – изучение распределения отдельных генотипов и аллелей генов воспалительного ответа *TNF α* (-308G>A и -238G>A), *PTPN22* (C1858T) и *MIF* (-173G>C) на представительной когорте практически здоровых лиц с целью опре-

деления популяционных частот указанных полиморфизмов для детского населения Республики Беларусь. Эти “non-HLA”-гены рассматриваются в числе наиболее значимых, предрасполагающих к развитию ряда АИЗ: сахарного диабета 1-го типа, ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, системной красной волчанки, системной склеродермии и других [3]. Характеристика включенных в исследование генов

/ полиморфизмов и их функции кратко представлены в табл. 1.

В Беларуси подобные генетические исследования на выборках детей не проводились. В работах Беляевой Л.М. и соавт. методом иммуноферментного анализа продемонстрировано достоверное увеличение содержания продукта гена *TNF α* (фактора некроза опухолей, ФНО- α) в сыворотке крови у детей с ювенильным ревматоидным артритом (ЮРА) ($p < 0,01$);

Таблица 1

Характеристика исследуемых полиморфизмов

Ген, продукт, локализация	Полиморфизм (идентификационный номер <i>SNP</i> в базе данных <i>NCBI</i> , <i>rs</i>)	Функция кодируемых геном белков
<i>PTPN22</i> протеин-тирозинфосфатаза нерцепторного типа, 22; <i>protein tyrosine phosphatas</i> , 22 1p13.м3-р13	1858 C>T (Arg620Trp) (<i>rs2476601</i>) Замена цитозина на тимин в 620-м кодоне приводит к синтезу триптофана вместо аргинина в белке LYP, что в конечном итоге приводит к длительной активации Т-лимфоцитов.	Специфическая лимфоидная тирозинфосфатаза LYP (<i>Lymphoid protein tyrosine phosphatase</i>) выполняет роль ингибитора активации и пролиферации Т-лимфоцитов, участвует в клеточной дифференцировке иммунокомпетентных клеток. Продуцируется в основном лимфоидной тканью (в Т- и В-лимфоцитах, моноцитах, нейтрофилах, дендритных клетках и естественных клетках-киллерах или НК-клетках) [4, 5].
<i>TNFα</i> ФНО – фактор некроза опухолей- α , <i>tumor necrosis factor</i> 6q21.33	-238 G>A (<i>rs361525</i>) -308 G>A (<i>rs1800629</i>) Замены гуанина на аденин в положениях промотора -238 и -308 приводят к изменению скорости транскрипции белка (к снижению экспрессии в случае замены в положении -238 и к повышению при замене в положении -308), вызывая тем самым изменение уровня продукции TNF- α (снижение и, соответственно, увеличение).	Цитокин с провоспалительной активностью, играет ключевую роль в развитии воспалительного ответа: инициирует синтез интерлейкинов, гамма-интерферона, активирует макрофаги, стимулирует пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, тем самым запуская каскад воспалительных реакций. Вовлечен в регуляцию широкого спектра биологических процессов, включая клеточную дифференцировку и пролиферацию, апоптоз, липидный метаболизм. Синтезируется в основном моноцитами и макрофагами, НК-клетками, нейтрофилами, кератиноцитами и астроцитами, а также рядом опухолевых клеточных линий [6, 7].
<i>MIF</i> MIF – фактор подавления миграции макрофагов, <i>macrophage inhibitory factor</i> 22q11.23	-173 G>C (<i>rs755622</i>) <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> доказано, что аллель -173C способствует увеличенной экспрессии гена <i>MIF</i> и повышенному уровню белка	Является регулятором врожденных и адаптивных иммунных реакций и функционирует как ключевой фактор «естественной устойчивости» клетки и организма. Основные и наиболее известные функции MIF как цитокина – это способность подавлять миграцию макрофагов и активировать их <i>in vitro</i> , способствовать формированию воспалительного очага с повышенной концентрацией макрофагов <i>in vivo</i> . В отличие от индуцибельного типа экспрессии, характерного для большинства цитокинов, MIF конститутивно образуется в ряде клеток организма, прежде всего в лимфоцитах, макрофагах, а также в эндотелиальных и эпителиальных клетках, гепатоцитах и нейронах [8, 9].

в работе Аксеновой Е.А. с соавт. (2010) дана оценка встречаемости частот генотипов / аллелей полиморфизма С1858Т гена *PTPN22* у взрослых этнических белорусов [10]. Наше исследование проведено на когорте детского населения г. Минска. Поскольку городское население городов-гигантов (Москва, Харьков, Минск и др.) представляет собой популяцию смешанного происхождения относительно генетических аспектов [11], то полученные в ходе работы данные распределения генотипов / аллелей указанных полиморфных локусов генов воспалительного ответа *TNF α* , *PTPN22* и *MIF* характеризуют популяционные частоты изученных *SNPs* у детского населения Республики Беларусь. Эти значения будут использованы в качестве контрольных показателей при оценке их значимости в качестве молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к развитию отдельных аутоиммунных заболеваний у детей и подростков.

Материалы и методы

Биологический материал

Работа по сбору биологического материала проведена сотрудниками 1-ой кафедры детских болезней на базе кардиологического отделения УЗ «2-я городская детская клиническая больница г. Минска» в соответствии с законодательством Республики Беларусь и международными нормами, закрепленными в Хельсинской декларации [12].

Объект исследования – геномная ДНК, выделенная из образцов крови стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [13].

Метод исследования

Для определения аллельных вариантов генов *TNF α* -308G>A (*rs1800629*) и -238G>A (*rs361525*), *PTPN22* C1858T (*rs2476601*), *MIF* -173G>C (*rs755622*) использован стандартный метод ПЦР-ПДРФ (полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом образующихся фрагментов) с разделением фрагментов либо в 2%-ном агарозном геле для *SNPs* *PTPN22* C1858T и *MIF* -173G>C, либо в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в случае исследования локусов гена *TNF α* .

Праймеры, условия проведения ПЦР, рестриктазы и продукты рестрикции, соответствующие гомозиготному / гетерозиготному состоянию полиморфных вариантов изученных генов в сравнении с диким типом, описаны ранее [14–17] и адаптированы к конкретным условиям.

Статистическая обработка

Для статистической обработки данных использован пакет стандартных программ Excel 2000. Данные по распределению частот генотипов в изученных выборках проверены на соответствие закону Харди-Вайнберга. Для выявления различий между частотами генотипов / аллелей в различных группах использовали критерий χ^2 или точный тест Фишера.

Результаты и обсуждение

В рамках данной работы нами обследована выборка из 162 человек детского и подросткового возраста. В нее вошли пациенты 2-ой ГКДБ г. Минска, имеющие в 82% случаев (73% мальчиков и 96% девочек) диагноз «вегетативная дисфункция» (нейроциркуляторная, вегетосудистая дистония). Вегетативная дисфункция – довольно распространенное состояние, характерное для любого возраста; но наиболее часто диагностируется у школьников [18]. У остальных 18% обследованных лиц отмечены изменения: 1) со стороны сердечно-сосудистой системы (малые аномалии развития сердца у детей; пролапс митрального клапана, дополнительная хорда левого желудочка); 2) варикоцеле у мальчиков и некоторые другие заболевания, не имеющие отношения к аутоиммунным и воспалительным. Половозрастная характеристика этой группы представлена в табл. 2.

Как видно из таблицы, соотношение по полу (ж / м) в обследованной группе составляет 41% / 59%; средний возраст – 14,02 ± 2,68 лет без существенных различий по возрасту между мальчиками и девочками.

Популяционные частоты полиморфных вариантов PTPN22 C1858T, MIF -173G>C, TNF α -238G>A и -308G>A

Для всей группы выполнено генотипирование по полиморфным локусам генов *TNF α* (-238G>A, -308G>A), *PTPN22* C1858T и *MIF* -173G>C.

Результаты, представляющие в данном случае популяционные частоты аллельных вариантов изученных генов у детского населения Беларуси, приведены в табл. 3. Отклонения частот генотипов изученных полиморфизмов от равновесия Харди-Вайнберга ни в одном случае не выявлено: по локусу C1858T *PTPN22* $p = 0,55$; по локусу -173G>C *MIF* $p = 0,328$; для гена *TNF α* -308G>A и -238G>A $p = 0,31$ и $0,59$, соответственно.

При анализе частот генотипов / аллелей -238A гена *TNF α* обращает на себя внимание низкая частота полиморфного (низкопродуктивного) аллеля -238A в общей когорте белорусских детей (4,1%) и, соответственно, низкая частота его гетерозиготного носительства (8,1%). По данным National Center for Biotechnology Information (NCBI), частота этого аллеля в исследованиях европейских авторов действительно невысокая – в среднем 7,7% (для европеоидов – в диапазоне 3,3–10,9%), частота гетерозигот – в среднем 15% (значения для европеоидов в разных исследованиях составляют 7, 13, 15, 19, 21

и 29%) [19]. Для нашей выборки характерно преобладание носителей дикого гомозиготного генотипа -238GG – почти 92%. Гомозиготный мутантный генотип -238AA нами не выявлен вовсе.

Частота мутантного аллеля -308A гена *TNF α* в различных популяциях варьирует от 3 до 27%: для азиатов она находится в пределах от 3 до 11%, для представителей Африки – от 6 до 20%, для афроамериканцев – 12–21% и достигает 24% для жителей Австралии [20].

Что касается полиморфизма *MIF* -173G>C, то, в соответствии с опубликованными данными, частоты минорного аллеля -173C варьируют в пределах 10–20% для стран Европы [21], для метисов Южной Америки характерны значения 25–26% [22]. Для азиатской популяции данные весьма неоднозначны: для японцев – 19–22% [20], для китайцев – от 11% [17] до 28% [23]. Частоты генотипов и аллелей в локусах *TNF α* -308G>A и *MIF* -173G>C, характерные для европейских популяций, представлены в табл. 4.

Таблица 2

Половозрастная характеристика группы контроля

Исследуемые параметры		Контроль (n = 162)
Соотношение по полу, % (девочки / мальчики)		41 / 59
Средний возраст, лет ($m^* \pm SD^{**}$)	Выборка	14,02 \pm 2,68
	Девочки	13,72 \pm 3,13
	Мальчики	14,24 \pm 2,29

* m – среднее значение; ** SD – стандартное отклонение.

Таблица 3

Популяционные частоты аллельных вариантов генов воспалительного ответа *PTPN22*, *TNF α* и *MIF* у детского населения Беларуси

Полиморфизм	Частота генотипов/аллелей		
	Гетерозигота / %	Гомозигота по полиморфному аллелю / %	Мутантный аллель / %
<i>TNFα</i> -238G>A	GA / 8,1	AA / 0	A / 4,1
<i>TNFα</i> -308G>A	GA / 21,0	AA / 0	A / 10,5
<i>MIF</i> -173G>C	GC / 27,3	CC / 4,4	C / 18,0
<i>PTPN22</i> C1858T	CT / 21,0	TT / 2,5	T / 13,0

Таблица 4

Частоты генотипов и аллелей генов *TNF α* -308G>A и *MIF* -173G>C в европеоидных популяциях

Страна	Расово-этническая принадлежность	AA / Aa / aa, n (%) *	MAF**	Ссылка
<i>TNFα</i> -308G>A				
Турция	Европеоиды	26(60) / 14(33) / 3(7)	23	[24]
Сербия	Европеоиды	37(57) / 22(34) / 6(9)	26	[25]
Германия	Европеоиды	51(63) / 28(35) / 2(2)	21	[26]
Германия	Европеоиды	132(67) / 61(31) / 3(2)	16	[27]
Португалия	Европеоиды	91(78) / 26(22) / 0	13	[28]
Италия	Европеоиды	109 (79) / 29(21) / 0	11	[29]
Чехия	Европеоиды	121(81) / 29(19) / 0	11	[30]
Россия	Европеоиды	134(71) / 48(25) / 7(4)	16	[31]
Россия	Европеоиды	220(73) / 78(26) / 3(1)	14	[32]
Беларусь	Европеоиды (возраст 14,02 ± 2,68 лет)	128 (79) / 34 (21) / 0	10	Данное исследование
<i>MIF</i> -173G>C				
Германия	Европеоиды	108 (68) / 45 (28) / 6(4)	18	[33]
Германия	Европеоиды	318 (65) / 156 (32) / 15(3)	19	[34]
Испания	Европеоиды	406 (77) / 107 (20) / 13(2)	13	[35]
Италия	Европеоиды	278 (78) / 75 (21) / 29 (1)	11	[36]
Польша	Европеоиды	99 (80) / 23(19) / 1(1)	10	[37]
Беларусь	Европеоиды (возраст 14,02 ± 2,68 лет)	111 (69) / 44 (27) / 7(4)	18	Данное исследование

*AA – гомозигота дикого типа, Aa – гетерозигота, aa – мутантная гомозигота; **MAF (minor allele frequency) – частота минорного аллеля, %

Как видно из таблицы, частоты встречаемости нормального (-308G) и мутантного (-308A) аллелей гена *TNF α* у европейцев находятся в пределах от 11 до 26% для мутантного аллеля A, и соответственно, от 74 до 89% для аллеля G; частота встречаемости гетерозигот -308GA – от 21 до 35%. Полученные нами результаты не отличаются от представленных: генотип *TNF α* -308GG определялся с частотой 79%, гетерозиготный генотип – 21%; а частоты встречаемости аллелей -308G и -308A составили 90 и 10%, соответственно.

Для локуса *MIF* -173G>C частоты гетерозиготного генотипа варьируют от 19% в работе польских авторов [37] до 28–32% в исследованиях из Германии [33, 34]. У обследован-

ных белорусских детей как частота гетерозиготного носительства -173GC *MIF* (27%), так и частота минорного аллеля -173C *MIF* (4%) выше значений, установленных для близких по этническому происхождению восточных славян Польши [37], однако наши данные не отличаются от частот, известных для ряда европейских стран.

Частота встречаемости минорного аллеля 1858T гена *PTPN22* существенно зависит от этнической принадлежности обследуемых лиц. Даже в пределах одной этнической группы частота генотипов/аллелей может варьировать. Так, в работе Аксеновой Е.А. с соавт. (2010) на выборке этнических белорусов (740 человек) показано, что частота гомозигот по

этому аллелю 1858ТТ для общей выборки равна 4,1%, тогда как с учетом регионов проживания она колеблется в пределах от 2,1% до 6,5% [10]. Частота гетерозигот *PTPN22* 1858СТ в исследовании этих же авторов в общей выборке составляла 26,1%, а с учетом региона проживания варьировала от 20,6 до 32,5%. Частота рискового аллеля 1858Т находилась в диапазоне 12,6–20,2% [10]. В работе российских исследователей О.Н. Ивановой и др. (2013) показано, что для представителей московской популяции частота аллеля 1858Т достигает 13% [38]. В работе Гусевой И.А. и соавт. (2016) частота аллеля 1858Т в русской популяции г. Москвы и области (314 чел.) составляла 12%, гетерозиготного генотипа СТ – 20% [39]. Таким образом, установленные нами частоты генотипов/аллелей С1858Т гена *PTPN22* у детского и подросткового контингента соответствуют данным для взрослого населения Беларуси и результатам, полученным другими авторами для популяций восточных славян.

Результаты генотипирования ДНК детей и подростков по изученным полиморфным локусам в зависимости от пола

Аутоиммунные болезни затрагивают до 10% населения в мире и среди пациентов до 80% – женщины. Механизмы подобного диморфизма не совсем понятны. Для аутоиммунных болезней взрослых одной из причин преобладания женщин среди пациентов с АИЗ является очевидное физиологическое различие уровней

половых гормонов, чье влияние на иммунную систему доказано [40]. Некоторые детские аутоиммунные болезни также проявляют заметную зависимость от пола. Так, ЮИА по олигоартритному типу преимущественно возникает у девочек, при этом задолго до начала половой зрелости, когда уровни андрогена и эстрогена у обоих полов одинаково низкие. Ювенильная системная склеродермия (*Juvenile systemic sclerosis*) развивается у девочек/мальчиков в соотношении 3,6:1, миастенический бульбарный паралич (*Myasthenia gravis*) в постпубертатном периоде – в соотношении 4,5:1, системная красная волчанка (*Juvenile systemic lupus erythematosus*) с дебютом в возрасте старше 10 лет в 4 раза чаще наблюдается у девочек. В то же время анкилозирующий спондилоартрит (*Ankylosing spondylitis*) и эозинофильный эзофагит (*Eosinophilic esophagitis*) в 3 раза чаще развиваются у мальчиков. Поэтому объективные причины и механизмы, лежащие в основе развития педиатрических аутоиммунных заболеваний, скорее всего, лежат за пределами различий в уровнях половых гормонов [41].

Поскольку многие аутоиммунные заболевания, включая ЮИА, проявляют гендерную специфичность (или своеобразный половой диморфизм) и в большей степени присущи девочкам, нам представлялось интересным проанализировать частоты встречаемости генотипов и аллелей трех изученных полиморфных локусов в соответствии с распределением обследуемых лиц по полу (табл. 5).

Таблица 5

Результаты генотипирования ДНК по изученным локусам в зависимости от пола

Полиморфизм	Генотип	Девочки		Мальчики	
		n	Частота, %	n	Частота, %
С1858Т (ген <i>PTPN22</i>)	СС	47	70	77	81
	СТ	19	28	15	16
	ТТ	1	2	3	3
	Аллель С	113	84	169	89
	Аллель Т	21	16	21	11
-308 G>A (ген <i>TNFα</i>)	GG	53	78	76	80
	GA	15	22	19	20
	Аллель G	121	89	171	90
	Аллель A	15	11	19	10

Продолжение табл. 5

Полиморфизм	Генотип	Девочки		Мальчики	
		n	Частота, %	n	Частота, %
-173G>C (ген <i>MIF</i>)	GG	40	65	66	70
	GC	18	29	26	27
	CC	4	6	3	3
	Аллель G	98	79	158	83
	Аллель C	26	21	32	17

В нашем исследовании участвовало 41% девочек и 59% мальчиков. Напомним, что существенных гендерных различий по возрасту в группе нет (табл. 1). При сравнении результатов генотипирования по полу не обнаружено существенных различий между частотами генотипов/аллелей трех изученных полиморфных локусов, за исключением частоты встречаемости гетерозигот C1858T *PTPN22*, которая у девочек (28%) оказалась выше, чем у мальчиков (16%) ($p = 0,053$).

Таким образом, выявлена четкая тенденция к увеличению гетерозиготного носительства C1858T гена *PTPN22* среди девочек без аутоиммунной патологии по сравнению с мальчиками, что указывает на гендер-специфическое распределение данного гетерозиготного генотипа в исследуемой группе детского и подросткового населения Беларуси, которое, однако, нуждается в подтверждении на расширенной выборке.

Сравнение частот встречаемости комбинированных генотипов изученных полиморфизмов в обследуемой группе

Основная часть обследованной группы представлена гомозиготными носителями мажорных аллелей трех изученных генов: 77% имеют генотип *PTPN22* C1858C, 79% – генотип *TNFA* -308GG и 68% – генотип *MIF* -173GG. Гомозиготные генотипы по минорным рисковым аллелям *PTPN22* 1858TT и *MIF* -173GG в общей выборке выявлены соответственно в 2-х и 4-х% случаев, тогда как гомозиготный генотип *TNFA* -308AA не определялся вообще. На примере исследованной выборки показано, что минорные аллели генов *PTPN22* 1858T, *MIF* -173C и *TNFA* -308A встречаются у детского населения Беларуси с частотой 13%, 18% и 11%, а гетерозиготное носительство указанных аллелей зарегистрировано в 21, 27 и 21% случаев соответственно. Именно наличие минорных аллелей этих генов воспалительного ответа связывают с риском развития аутоиммунных заболеваний.

Для всей выборки детей и подростков также установлены частоты комбинированных полиморфных генотипов / аллелей трех изученных генов и проведено сравнение их встречаемости в зависимости от пола (рис. 1).

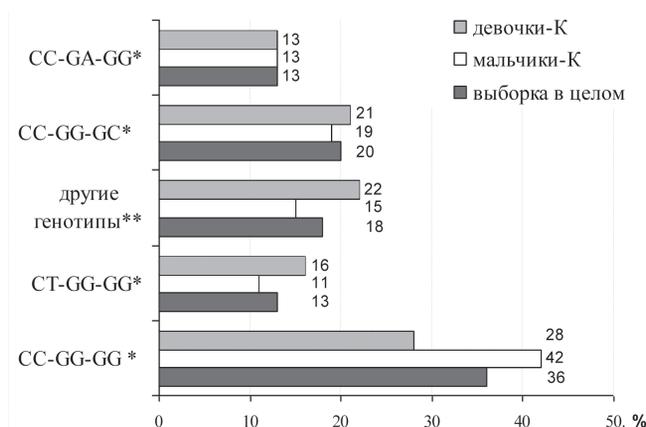


Рис. 1. Распределение комбинированных генотипов изученных полиморфных локусов в исследованных выборках
* – генотипы указаны в порядке следования полиморфных локусов генов *PTPN22* 1858, *TNFA* 308, *MIF* 173;
** – генотипы TT-GG-CC, TT-GG-GG, CT-GA-GC, CT-GA-GG, CT-GG-GC, CT-GG-CC, CC-GG-CC, CC-GA-GC

Среди обследованных лиц 36% (59 человек) имели генотип, сочетающий гомозиготные мажорные аллели трех генов $CC_{PTPN22}-GG_{TNF\alpha}-GG_{MIF}$ который определялся чаще всего и в подгруппах девочек / мальчиков (28% / 42%). Несмотря на заметное преобладание мальчиков с подобным генотипом, частоты комбинаций между группами достоверно не различались ($p = 0,073$).

Комбинированный генотип $CC_{PTPN22}-GG_{TNF\alpha}-GC_{MIF}$ встречался у 20% детей независимо от пола. Отсутствие различий между полами наблюдалось также и при анализе распределения комбинированных генотипов $CC_{PTPN22}-GA_{TNF\alpha}-GG_{MIF}$ и $CT_{PTPN22}-GG_{TNF\alpha}-GG_{MIF}$: частоты их встречаемости (от 11 до 17%) одинаковы как в общей группе, так и в подгруппах девочек / мальчиков. В группу «другие» включены 8 комбинированных генотипов, частота встречаемости которых незначительна – во всей выборке они выявлены у одного-двух, максимум у пяти-шести человек. Как видно из рисунка, в таких генотипах присутствуют минорные аллели по изученным локусам, что и обуславливает их «редкость» у практически здоровых лиц.

Таким образом, данные, полученные нами на выборке детей и подростков, показывают, что среди мальчиков чаще встречаются носители комбинированного генотипа, сочетающего гомозиготные мажорные аллели трех изученных генов воспалительного ответа: $CC_{PTPN22}-GG_{TNF\alpha}-GC_{MIF}$.

Заключение

В качестве популяционного контроля обследована выборка детского контингента Республики Беларусь без аутоиммунных заболеваний, состоящая из 162 человек, среди которых девочки составляли 41% и мальчики – 59%. Средний возраст обследованных составил $14,02 \pm 2,68$ лет без существенных различий между мальчиками и девочками.

Определены популяционные частоты генотипов/аллелей по локусам С1858Т *PTPN22*, -173G>С *MIF*, -238G>А и -308G>А *TNF α* , контролирующим воспалительный ответ. Полученные значения полностью соответствуют характеру их распределения у европеоидного населения. Основная часть обследованной группы в нашей работе представлена гомози-

готными носителями мажорных аллелей трех изученных генов: 77% имеют генотип *PTPN22* С1858С, 79% – генотип *TNF α* -308GG и 68% – генотип *MIF* -173GG. Выявлены гендерные различия в распределении гетерозиготного генотипа С1858Т гена *PTPN22* в группе детей и подростков без аутоиммунной патологии: частота встречаемости этого генотипа у девочек почти в 2 раза превышала его частоту у мальчиков ($p = 0,053$). Также показано, что среди мальчиков чаще встречаются носители комбинированного генотипа, сочетающего гомозиготные мажорные аллели трех изученных генов $CC_{PTPN22}-GG_{TNF\alpha}-GC_{MIF}$ (42% против 28% у девочек, $p = 0,073$). Выявленные тенденции нуждаются в дальнейшем изучении, так как могут внести определенный вклад в понимание гендер-специфичности ряда аутоиммунных заболеваний.

Выполненное исследование имеет самостоятельную значимость, поскольку характеризует частоты аллельных вариантов генов воспалительного ответа *TNF α* , *PTPN22* и *MIF*, а также некоторые особенности распределения отдельных генотипов с учетом гендерных различий у детей из белорусской популяции. Кроме того, полученные результаты будут использованы в качестве контрольных показателей при выявлении молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к развитию аутоиммунных заболеваний, представляющих одну из актуальнейших проблем педиатрии в связи с их высокой распространенностью, трудностями ранней диагностики, быстрой инвалидизацией и существенным снижением качества жизни пациентов.

Список использованных источников

1. Насонов, Е.Л. Достижения ревматологии в XXI в. / Е.Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. – 2014. – Т. 52, № 2. – С. 133–140. DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2014-133-140>.
2. Hersh, A.O. Immunogenetics of juvenile idiopathic arthritis: A comprehensive review / A.O. Hersh, S. Prahalad // Journal of Autoimmunity. – 2015. – <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.002>.
3. *PTPN22* Genetic Variation: Evidence for Multiple Variants Associated with Rheumatoid Arthritis / V.E.H. Carlton [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2005. – Vol. 77. – P. 567–581. – doi: 10.1086/468189.

4. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes / N. Bottini [et al.] // *Nature Genetics*. – 2004. – Vol. 36. – P. 337–338. – doi:10.1038/ng1323.
5. The tyrosine phosphatase PTPN22 discriminates weak self peptides from strong agonist TCR signals / R.J. Salmond [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2014. – N 15. – P. 875–883.
6. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplantant patients / H. Fernandes [et al.] // *Transplantation*. – 2002. – Vol. 73. – P. 1886–1891.
7. Qidwai, T. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence / T. Qidwai, F. Khan // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 74. – P. 522–547.
8. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis / R. Donn [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2002. – Vol. 46. – P. 2402–2409.
9. Суслов, А.П. Фундаментальная иммунология провоспалительных цитокинов и MIF / А.П. Суслов, М.В. Коноплева, О.Ю. Третьяков // *Медицинская Иммунология*. – 2006. – Т. 8, № 1. – С. 5–22.
10. Частоты аллелей риска некоторых генов, контролирующих развитие аутоиммунных патологий, в белорусской популяции / Е.А. Аксенова [и др.] // *Экологическая генетика человека*. – 2010. – Т. VIII, № 1. – С. 50–58.
11. Особенности генетико-демографических процессов в населении трех мегаполисов в связи с проблемой создания генетических баз данных / О.Л. Курбатова [и др.] // *Генетика*. – 2013. – Т. 49, № 1. – С. 513–522.
12. Declaration of Helsinki (Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects) [Electronic resource] // *World Medical Association*. – 59th WMA General Assembly, Seoul, October 2008 – Mode of access: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>.
13. Sambrook, J. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. – 2nd ed. – Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – P. 9.14–9.23.
14. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product / A.G. Wilson [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1992. – Vol. 1, № 5. – P. 353.
15. Association of -238G/A and -857C/T Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Promoter Region With Outcomes of Hepatitis B Virus Infection / H-Q. Li [et al.]. // *Biomedical and environmental sciences*. – 2006. – Vol. 19. – P. 133–136.
16. Zheng, W. Genetic Association Between a Lymphoid Tyrosine Phosphatase (PTPN22) and Type 1 Diabetes / W. Zheng, J-X. She // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54. – P.906–908.
17. A genetic role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in adult-onset Still's disease / F-F. Wang [et al.] // *Arthritis Research & Therapy*. – 2013. – Vol. 15, R65. – P. 2-8. – doi:10.1186/ar4239.
18. Заваденко, Н.Н. Клинические проявления и лечение синдрома вегетативной дисфункции у детей и подростков / Н.Н. Заваденко, Ю.Е. Нестеровский // *Педиатрия*. – 2012. – Т. 91, № 2.
19. The Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP), TNF- α at -238 (rs361525). (*Homo sapiens*). [Electronic resource] / National Center for Biotechnology Information. – Bethesda M.D., USA. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=361525.
20. Meta-analysis of TNF 308 G/A polymorphism and type 2 diabetes mellitus / R.N. Feng [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – e18480. doi: 10.1371/journal.pone.0018480.
21. The -173 G/C Polymorphism of the MIF Gene and Inflammatory Bowel Disease Risk: A Meta-Analysis / Y. Shen [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 11 392–11 401. – doi:10.3390/ijms140611392.
22. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promoter polymorphisms (-794 CATT and -173 G>C): association with MIF and TNF α in psoriatic arthritis / R. Morales-Zambrano [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 7, № 9. – P. 2605–2614.
23. Macrophage migration inhibitory factor gene -173G>C polymorphism and risk of bladder cancer in southeast China: a case-control analysis / Q. Yuan [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* –

2012. – Vol. 39. – P. 3109–3115. – doi 10.1007/s11033-011-1075-9.

24. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in patients with familial Mediterranean fever / A. Celebi Kobak [et al.] // Clin Rheumatol. – 2007. – Vol. 26. – P. 908–910.

25. Etanercept reduces matrix metalloproteinase-9 level in children with polyarticular juvenile idiopathic arthritis and TNF-alpha-308GG genotype / J. Basic [et al.] // J. Physiol. Biochem. – 2010. – Vol. 66. – P. 173–180. – doi: 10.1007/s13105-010-0022-x.

26. Rapid genotyping for tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-863C/A promoter polymorphism that determines TNF-alpha response / M. Heesen [et al.] // Clin. Chem. – 2004. – Vol. 50. – P. 226–228.

27. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in patients with juvenile idiopathic arthritis / H. Schmeling [et al.] // Clin. Exp. Rheumatol. – 2006. – Vol. 24. – P. 103–108.

28. Tumor necrosis factor-alpha -308 genotypes influence inflammatory activity and TNF-alpha serum concentrations in children with juvenile idiopathic arthritis / A.F. Mourao [et al.] // J. Rheumatol. – 2009. – Vol. 36. – P. 837–842.

29. Association between -G308A tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and schizophrenia / F. Boin [et al.] // Molecular Psychiatry. – 2001. – Vol. 6. – P. 79–82.

30. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter is associated with severity of rheumatoid arthritis in the Czech population / P. Nemeš [et al.] // Clin. Rheumatol. – 2008. – Vol. 27. – P. 59–65.

31. Роль полиморфизма в промоторной области гена *TNF* в развитии хронической обструктивной болезни легких / Г.Н. Сеитова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2004. – С. 29–34.

32. Ассоциативная взаимосвязь генетических маркеров с эффективностью лечения ревматоидного артрита тоцилизумабом / И.А. Гусева [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2013. – Т. 51, № 4. – P. 377–382.

33. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173G/C promoter polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement and disease activity in patients with Crohn's disease / J. Dambacher [et al.] // Inflamm. Bowel Dis. – 2007. – Vol. 13. – P. 71–82.

34. A polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor gene is involved in the genetic predisposition of Crohn's disease and associated with cumulative steroid doses / T. Griga [et al.] // Hepatogastroenterology. – 2007. – Vol. 54. – P. 784–786.

35. Association of the macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with inflammatory bowel disease / J. Oliver [et al.] // Gut. – 2007. – Vol. 56. – P. 150–151.

36. Association of the macrophage migration inhibitory factor -173*С allele with childhood nephrotic syndrome / A. Berdeli [et al.] // Pediatr. Nephrol. – 2008. – Vol. 23. – P. 743–748. – doi 10.1007/s00467-007-0729-2.

37. Contribution of the -173 G/C polymorphism of macrophage migration inhibitory factor gene to the risk of inflammatory bowel diseases / K. Przybyłowska [et al.] // Pol. Przegl. Chir. – 2011. – Vol. 83. – P. 76–80.

38. Ассоциация полиморфизма гена *RTPN22* с сахарным диабетом 1 типа в различных популяциях РФ / О.Н. Иванова [и др.] // Сахарный диабет (Diabetes mellitus). – 2013. – № 2 (59). – С. 4–10.

39. Исследование полиморфизмов генов-кандидатов иммунного ответа как маркеров риска развития ревматоидного артрита и продукции аутоантител / И.А. Гусева [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2016. – Т. 54, № 1. – С. 21–30.

40. Whitacre, C.C. Sex differences in autoimmune disease. -onset juvenile idiopathic arthritis / C.C. Whitacre // Nat. Immunol. – 2001. – Vol. 2, № 9. – P. 777–780.

41. Chiaroni-Clarke, R.C. Sex bias in paediatric autoimmune disease – Not just about sex hormones? / R.C. Chiaroni-Clarke, J.E. Munro, J.A. Ellis // J. Autoimmun. – 2016. – Vol. 69. – P. 12–23. – doi: 10.1016/j.jaut.2016.02.011.

N.V. Savina¹, N.V. Nikitchenko¹, T.D. Kuzhir¹, E.V. Sechko², A.M. Chichko², A.V. Sukalo², R.I. Goncharova¹

FREQUENCIES OF GENOTYPES AND ALLELES OF POLYMORPHIC LOCI OF INFLAMMATORY RESPONSE GENES *PTPN22*, *TNF α* AND *MIF* IN CHILDREN AND ADOLESCENTS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

¹Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University
Dzerzhinski Ave., 83, Minsk, the Republic of Belarus, 220116

PTPN22 C1858T, *MIF* -173G>C, *TNF α* -238G>A and -308G>A loci associated with the inflammatory response were identified in 162 individuals (children and adolescents) from the Belarusian population. In our study, frequencies of genotypes/alleles in these loci were similar to those in other Caucasian populations and can be used as control indices when revealing genetic markers of predisposition to some autoimmune diseases. Gender specific differences were found in the distribution of heterozygous *PTPN22* C1858T genotype in a group of children and adolescents with no autoimmune and inflammatory pathology: namely, the frequency of this genotype in females exceeded almost twice that in males ($p = 0.053$). Besides, carriers of the complex genotype, combining major alleles of the genes studied (CC_{*PTPN22*}-GG_{*TNF α*} -GC_{*MIF*}), occurred more often among males than females (42% vs. 28% respectively, $p = 0.07$). These trends confirmed in larger samples could contribute to the comprehension of gender specificity of a set of autoimmune diseases.

Key words: autoimmune diseases, genes of the inflammatory response, polymorphic loci *TNF α* 308G>A and -238G>A, *MIF* -173G>C and *PTPN22* C1858T

Дата поступления статьи 10 января 2017 г.

С.А. Котова, Е.А. Заблоцкая, Е.А. Спивак, В.И. Рыбакова, Д.Э. Недзвецкая, И.С. Цыбовский

ПЕРЕКРЕСТНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ В ИССЛЕДОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ВИДОВ ОТРЯДА *ARTIODACTYLA* (ПАРНОКОПЫТНЫЕ)

Государственное учреждение «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь»
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Филимонова, 25
e-mail: tsybovsky@yahoo.com

В статье приведены экспериментальные исследования межтаксонных молекулярно-генетических различий видов животных внутри отряда Парнокопытные, полученные на основе использования специфичных STR-маркеров для адресного генотипирования ДНК таксономически близких видов. ДНК пяти видов – лося, косули, кабана, оленя благородного и быка – генотипировали с использованием 12 бычьих, 6 свиных, 13 оленьих и 5 маркеров северного оленя. Показана смена статуса ряда STR-локусов с полиморфного на мономорфный или неамплифицируемый. Подтверждены и количественно охарактеризованы изменения размерных диапазонов аллелей при межтаксонном переносе маркеров. Сделан вывод о возможности использования такой дифференциации между таксономическими единицами в идентификационных целях.

Ключевые слова: микросателлиты, парнокопытные, дикие животные, перекрестная амплификация, полиморфизм.

Введение

Феномен перекрестной амплификации (cross-species amplification) в настоящее время широко используется для решения фундаментальных и прикладных задач на основе исследования генетического полиморфизма филогенетически родственных видов животных и растений. Перенос праймеров от вида-источника (вид, для которого микросателлитный маркер был изначально разработан) к целевому виду (вид, на котором апробируется указанный маркер) реализуется на основе достаточно высокого уровня консервативности последовательностей, ограничивающих интересные локусы у генетически родственных видов. Возможность перекрестного использования праймеров создает основу для изучения полиморфизма тех видов, детальные сведения о структуре генома которых недоступны.

Различия между таксонами разного уровня возникают благодаря процессу накопления мутаций в примыкающих к локусу областях. Перекрестная амплификация становится менее вероятной с усилением эволюционной дивергенции между видами в силу случайного накопления мутаций во фланкирующих обла-

стях [1]. При нарастании филогенетической дистанции между видами такое ограничение перекрестной применимости микросателлитного локуса может сначала проявляться нарушением амплификации и, следовательно, невыявлением отдельных аллелей (так называемых нуль-аллелей) [2]. Возникающая неполная гомология праймер-связывающих участков у целевых видов в конечном счете изменяет характер выявления ПЦР-продукта, вплоть до полного его отсутствия (неамплифицируемости). В ряде случаев локус у близкородственных видов утрачивает полиморфизм: выявляемый продукт ПЦР на базе переноса праймеров одинаков для всех особей данного вида (мономорфные локусы). Ряд локусов сохраняет полиморфизм, но параметры его варибельности могут значительно различаться у близкородственных видов, начиная от числа аллелей вплоть до сдвига в большую или меньшую сторону размерного диапазона аллелей соответствующего локуса по сравнению с видом-источником [3].

Виды отряда Парнокопытные (*Artiodactyla*) сопутствуют человечеству на протяжении всего его существования. Наиболее распро-

страненные объекты охоты – дикий кабан, косуля, лось, олень – относятся к отряду Парнокопытные. К этому же таксону относится большинство одомашненных сельскохозяйственных животных (бык, коза, овца, свинья и др.). Достоверная дифференциация и идентификация таксонов отряда Парнокопытные имеет большое значение в правоохранительной области, поскольку правонарушения имущественного характера в отношении объектов животного мира являются обычным явлением. Правонарушения в отношении объектов дикой природы (незаконная охота) не только наносят ущерб экономическим интересам государства, но могут быть причиной возникновения проблем экологического характера, поскольку приводят к неконтролируемым изменениям в естественных биоценозах.

Целью данной работы явилось изучение таксономических особенностей проявления переноса праймеров в кругу филогенетически родственных видов отряда Парнокопытные.

Материалы и методы

Изучение межтаксонных молекулярно-генетических различий диких животных внутри отряда Парнокопытные проводили путем генотипирования образцов мышечной и/или хрящевой ткани животных. В качестве представителя семейства Свиные подотряда Жвачные выступал дикий кабан (лат. *Sus scrofa scrofa*). В рамках подотряда Жвачные рассматривались три вида диких животных семейства Оленевые: Лось европейский (лат. *Alces alces*), Косуля европейская (лат. *Capreolus capreolus*) и Олень благородный (лат. *Cervus elaphus*). В качестве представителей семейства Полорогие исследовались образцы, полученные от Быка (лат. *Bos taurus*).

ДНК из образцов выделяли по общепринятой методике, основанной на высвобождении ДНК в ходе инкубации образцов биологического материала в лизирующем буфере, содержащем 2% SDS, 20 мМ трис-НСl, 100 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА, pH 8,0 и протеиназу К [4] при 56 °С. Лизат подвергали стандартной процедуре первичной очистки фенолом и хлороформом [5] в присутствии 1,0 М перхлората натрия NaClO₄ с последующим осаждением 1 объемом изопропилового спирта. Высу-

шенный осадок ДНК растворяли в ТЕ-буфере следующего состава: 10 мМ трис-НСl, 0,1 мМ ЭДТА, pH 8,0.

Генотипирование локусов северного оленя карибу [6], быка [7], оленя благородного [8], кабана [9] проводили в монолокусном режиме в реакционной смеси объемом 10 мкл следующего состава: 10 мМ трис-НСl pH 8,6; 50 мМ KCl; 0,01 % Tween-20; 0,2 мМ каждого из дНТФ; 0,5 ед. активности *Taq*-ДНК-полимеразы (Праймтех, Беларусь); 0,5–5 нг анализируемой ДНК. Концентрация MgCl₂ составляла 2,0 мМ для локусов быка и оленя благородного, 2,5 мМ – для локусов кабана и 2–3 мМ – для локусов карибу. Конечная концентрация для каждой пары праймеров устанавливалась эмпирически и находилась в диапазоне 0,1–0,4 мкМ каждого из пары праймеров для локусов быка; 0,2–1,0 мкМ – для локусов оленя; 0,1–0,6 мкМ – для локусов карибу и 0,2–1,0 мкМ – для кабана. Условия гетерологичной амплификации локусов у целевых видов соответствовали условиям ПЦР у видов-источников.

Фрагментный анализ продуктов ПЦР проводили методом капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Applied Biosystems, США) в режиме генотипирования или MegaBACE 750 (Amersham Biosciences, США). Для спектральной калибровки ДНК-секвенатора использовали матричный стандарт для 5 красителей (FAM, R6G, TAMRA, ROX, LIZ – Синтол, РФ). Определение размеров выявленных фрагментов в исследуемых локусах проводили с использованием внутреннего стандарта размера GeneScan-600 LIZ SizeStandard v.2.0 и специализированной программы GeneMapper®ID-X для автоматического секвенатора AB 3500, а также внутреннего стандарта ET550-R Size Standard и специализированного программного пакета MegaBACE Genetic Profiler v.2.2 для анализатора MegaBACE 750. Исчисление размеров продуктов ПЦР проводили по количеству пар нуклеотидов (п.н.).

Результаты и обсуждение

Проведена апробация четырех групп STR-маркеров: 12 бычьих (вид-источник – бык), 6 свиных (вид-источник – свинья домашняя), 13 оленьих (вид-источник – олень благородный) и 5 маркеров карибу (вид-источник – северный олень) – на матрицах ДНК пяти близ-

кородственных целевых видов в рамках отряда Парнокопытные (лося, косули, кабана, оленя благородного и быка). В ходе исследования решались следующие задачи:

1) выявление возможности применения микросателлитов, широко используемых для одного из видов отряда Парнокопытные, для анализа филогенетически близких ему видов,

находящихся на территории Республики Беларусь;

2) сопоставление полученных генетических профилей различных видов, направленное на выявление межтаксонных различий в особенностях проявления (моно- или полиморфность), а также в размерных диапазонах проявления каждого маркера.

Полученные результаты обобщены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Перекрестная применимость бычьих и свиных микросателлитных маркеров к близкородственным видам

Вид-источник маркера	Название маркера (локуса)	Целевые виды				
		Бык (<i>B. taurus</i>)	Олень благородный (<i>C. elaphus</i>)	Косуля европейская (<i>C. capreolus</i>)	Лось (<i>A. alces</i>)	Кабан (<i>S. scrofa</i>)
Бык <i>Bos taurus</i>	BM1824	P	M	M	M	N
	ETH225	P	P	P	P	N
	TGLA122	P	P	P	M	N
	BM2113	P	N	N	N	N
	ETH10	P	N	N	N	N
	ETH3	P	N	N	N	N
	TGLA227	P	N	N	N	N
	INRA023	P	M	N	P	N
	TGLA53	P	P	N	P	N
	HEL1	P	N	N	N	N
	TGLA126	P	M	M	P	N
CSSM036	P	M	P	M	N	
Кабан <i>Sus scrofa</i>	S0005	N	N	N	N	P
	S0101	N	N	N	N	P
	S0155	N	N	N	N	P
	SW240	N	N	N	N	P
	SW24	N	N	N	N	P
	SW857	N	N	N	N	P

Таблица 2

Перекрестная применимость оленьих микросателлитных маркеров и маркеров карibu к близкородственным видам

Вид-источник маркера	Название маркера (локуса)	Целевые виды				
		Бык (<i>B. taurus</i>)	Олень благородный (<i>C. elaphus</i>)	Косуля европейская (<i>C. capreolus</i>)	Лось (<i>A. alces</i>)	Кабан (<i>S. scrofa</i>)
Олень благородный <i>C. elaphus</i>	T156	M	P	P	P	N
	T530	M	P	M	P	N
	T26	N	P	P	P	N

Продолжение табл. 2

Вид-источник маркера	Название маркера (локуса)	Целевые виды				
		Бык (<i>B. taurus</i>)	Олень благородный (<i>C. elaphus</i>)	Косуля европейская (<i>C. capreolus</i>)	Лось (<i>A. alces</i>)	Кабан (<i>S. scrofa</i>)
Олень благородный <i>C. elaphus</i>	T108	N	P	M	M	N
	T501	N	P	M	P	N
	C01	M	P	P	M	N
	T507	N	P	P	P	N
	T268	M	P	P	P	N
	C273	M	P	M	M	N
	T172	M	P	P	M	N
	T107	N	P	N	N	N
	T193	M	P	P	P	N
T123	N	P	M	P	N	
Карибу <i>R. tarandus</i>	RT5	N	M	N	P	N
	RT6	N	M	M	P	N
	RT9	P	M	M	P	N
	RT24	M	M	M	P	N
	RT30	N	N	P	P	N

Анализ продуктов ПЦР для каждого целевого вида включал следующие параметры: отсутствие амплификации целевого продукта – группа неамплифицируемых («N») локусов; наличие ожидаемого целевого продукта – группа амплифицируемых STR-локусов («M» – группа мономорфных локусов и «P» – группа полиморфных локусов).

STR-маркеры относили к неамплифицируемым в случае, если во всех исследованных образцах ДНК данного вида животного продукты ПЦР отсутствовали, либо выявлялось большое количество неспецифических фрагментов различной длины. К амплифицируемым относили маркеры, у которых со всеми исследованными образцами ДНК данного вида животного выявлялось по одному (гомозигота, т.е. 2 одинаковых аллеля) или по два (гетерозигота, т.е. 2 разных аллеля) относительно четких специфических фрагмента.

Из 12 бычьих маркеров, исследованных на близкородственных целевых видах, 7 маркеров амплифицировались у оленей и лосей и 5 маркеров – у косуль; из 13 оленьих STR-локусов – 7 амплифицировались у коров, 12 – у косуль и у лосей; из 5 маркеров карибу специфичные продукты у коров были выявле-

ны для 2 маркеров, 4 маркера амплифицировались у оленей и косуль и все 5 – у лосей. Среди свинных STR-локусов не оказалось ни одного, которые бы амплифицировались у коров, оленей, косуль и лосей. Причиной наблюдаемого явления, очевидно, является то, что филогенетическая дистанция между диким кабаном (подотряд Нежвачные) и представителями семейства Оленевые значительно больше, чем между семейством Полорогие и семейством Оленевые, поскольку оба семейства относятся к одному подотряду Жвачные.

Из 36 маркеров, протестированных на первичной выборке дикого кабана, все 6 микросателлитов домашних свиней были полиморфными у дикого кабана. Все исследованные STR-маркеры быка, оленя и карибу не дали специфичного ампликона на матрицах ДНК дикого кабана.

Для подтверждения установленных феноменов мономорфности или полиморфности амплифицируемых локусов у различных видов был дополнительно проведен анализ конкретных локусов на основе более полных выборок ($n = 18-46$). Продукты ПЦР идентифицировали путем капиллярного электрофоретического разделения в генетическом анализаторе, что

позволило провести точный сравнительный анализ молекулярных размеров целевых продуктов. Полученные результаты приведены в табл. 3 и 4. Включенные в сводные таблицы размерные диапазоны бычьих микросателлитных маркеров у быка получены из литературных данных [10, 11].

Анализ данных, приведенных в табл. 3, показывает, что статус моно-/ полиморфности, изначально присвоенный маркерам по итогам первичного исследования, был подтвержден для всех протестированных локусов на расширенных выборках. При этом на расширенной выборке лося ($n = 42$) для локуса TGLA53 показано выявление у всех исследованных особей двух неизменных фрагментов длиной 145 и 149 п.н., что на данном этапе исследования дает основание по-прежнему относить этот STR-маркер к мономорфным для данного вида, считая такую особенность проявления псевдогетерозиготностью. У косуль в локусе CSSM036 также не было обнаружено других вариантов аллелей, кроме двух выявленных ранее (аллели 160 и 162).

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными об ожидаемой вероятности успешного испытания маркера

на близкородственном таксоне у млекопитающих, составляющей >40% [12]. Так, при переносе праймеров бычьих STR-локусов на семейство Оленевые в составе того же подотряда Жвачные было выявлено 6 маркеров из 12 исследованных, которые хотя бы у одного из видов семейства Оленевые проявили полиморфизм, что составляет 50% протестированных микросателлитов. В то же время среди свиных микросателлитов такой процент не реализовался, поскольку имел место перенос маркеров не только за пределы семейства, но и за пределы подотряда.

При использовании бычьих локусов для генотипирования ДНК таксономически близких видов были установлены различные формы проявления полиморфизма (табл. 3). Так, например, локус ETH225 оказался полиморфным у лося, косули и оленя, при этом молекулярные размеры ПЦР-продуктов имеют один и тот же диапазон значений: 143–164 п.н. у всех трех видов. Вместе с тем, для данного локуса можно ожидать количественные различия в спектре выявляемых аллелей: нами было детектировано 6 аллелей для лося ($n = 42$), в то время как для оленей – только 3 алельных варианта.

Таблица 3

Аллельный полиморфизм бычьих ДНК-маркеров у представителей отряда Парнокопытные

Вид-источник маркера	Название маркера (локуса)	Подотряд Жвачные							
		Семейство Половогие		Семейство Оленевые					
		Бык (<i>B. taurus</i>)		Олень благородный (<i>C. elaphus</i>) $n = 46$		Косуля европейская (<i>C. capreolus</i>) $n = 38$		Лось (<i>A. alces</i>) $n = 42$	
		Размер аллелей, п.н.	N	Размер аллелей, п.н.	N	Размер аллелей, п.н.	N	Размер аллелей, п.н.	N
Бык <i>Bos taurus</i>	BM1824	178–192	7	143	1	143	1	143	1
	ETH225	140–152	6	145–164	3	145–155	4	143–155	6
	TGLA122	144–183	14	149–151	2	126–128	2	134	1
	BM2113	125–139	6	–	–	–	–	–	–
	ETH10	209–225	7	–	–	–	–	–	–
	ETH3	117–129	6	–	–	–	–	–	–
	TGLA227	81–103	9	–	–	–	–	–	–
	INRA023	200–216	8	198	1	–	–	221–223	2

Продолжение табл. 3

Вид-источник маркера	Название маркера (локуса)	Подотряд Жвачные							
		Семейство Половогие		Семейство Оленевые					
		Бык (<i>B. taurus</i>)		Олень благородный (<i>C. elaphus</i>) <i>n</i> = 46		Косуля европейская (<i>C. capreolus</i>) <i>n</i> = 38		Лось (<i>A. alces</i>) <i>n</i> = 42	
		Размер аллелей, п.н.	N	Размер аллелей, п.н.	N	Размер аллелей, п.н.	N	Размер аллелей, п.н.	N
Бык <i>Bos taurus</i>	TGLA53	152–188	16	173–183	3	–	–	145/149	2
	HEL1	104–112	3	–	–	–	–	–	–
	TGLA126	111–123	7	110	1	114	1	112–122	2
	CSSM036	163–185	5	158	1	160–162	2	172	1

Примечание. «–» – отсутствие продуктов амплификации; N – число выявленных аллелей. Размеры аллелей указаны для генетического анализатора MegaBACE 750

Таблица 4

Аллельный полиморфизм оленьих микросателлитных маркеров у представителей отряда Парнокопытные

Вид-источник маркера	Название маркера (локуса)	Подотряд Жвачные							
		Семейство Половогие		Семейство Оленевые					
		Бык (<i>B. taurus</i>) <i>n</i> = 41		Олень благородный (<i>C. elaphus</i>) <i>n</i> = 46		Косуля европейская (<i>C. capreolus</i>) <i>n</i> = 38		Лось (<i>A. alces</i>) <i>n</i> = 42	
		Размер аллелей, п.н.	N	Размер аллелей, п.н.	N	Размер аллелей, п.н.	N	Размер аллелей, п.н.	N
Олень благородный <i>C. elaphus</i>	T156	138	1	134–182	10	181–197	2	146–154	4
	T530	231	1	247–288	14	247	1	221–229	3
	T26	–	–	308–358	11	338–358	6	321–353	6
	T108*	–	–	137–177	7	130	1	125	1
	T501	–	–	229–257	9	226	1	121,217	2
	C01	275	1	240–332	6	285–287	2	288	1
	T507	–	–	140–210	15	87–107	2	121–129	3
	T268	193	1	206–250	11	209–239	2	211–239	6
	C273	111	1	121–151	3	127	1	137	1
	T172	145	1	163–199	9	153–201	7	145	1
	T107	–	–	239–249	5	–	–	–	–
	T193	167	1	173–225	8	165–169	2	208–232	6
	T123	–	–	145–191	11	147	1	149–153	2
Карибу <i>R. tarandus</i>	RT5	–	–	146	1	–	–	163–171	4
	RT6	–	–	106	1	85	1	117–121	3
	RT9*	117–128	5	107,109	2	101,103	2	118–129	5
	RT24*	207	1	185	1	192	1	240–271	12
	RT30	–	–	–	–	184–206	4	169–208	6

Примечание. «–» – отсутствие продуктов амплификации; N – число выявленных аллелей. Размеры аллелей указаны для генетического анализатора MegaBACE 750 (* – для генетического анализатора AB 3500)

В случае локуса TGLA122 полиморфизм показан только для ДНК оленей и косули, при этом наблюдается значительная разница в размерах выявляемых фрагментов: у косули – 126–128 п.н., а у оленя – 149–151 п.н. Для лося данный локус является мономорфным с молекулярным размером продукта, равным 134 п.н. Точные значения для других локусов указаны в табл. 3.

Из 7 маркеров, амплифицируемых на близкородственных видах, 5 бычьих микросателлитов (ETH225, INRA023, TGLA53, TGLA126, CSSM036) давали фрагменты, которые у всех целевых видов (в случае амплифицируемости) были близки к границам размерного диапазона, характерного для вида-источника (отличия не более 2–7 п.н.). В то же время, в случае локуса TGLA122 дистанция между аллельными диапазонами быка и косули составляет 16 п.н., между аллельными размерами быка и лося – 10 п.н. Максимальное различие в длине ампликонов быка с одной стороны и всех остальных исследованных видов, с другой, наблюдается в локусе BM1824 при мономорфном выявлении у всех исследованных представителей семейства Оленевые.

При перекрестной амплификации оленьих локусов также были выявлены специфичные формы проявления полиморфизма в зависимости от видовой принадлежности исследуемой ДНК (табл. 4). Для 7 оленьих маркеров, которые амплифицируются у быков (из 13 исследованных) и имеют мономорфное проявление, размеры аллелей незначительно отличаются от вида-источника – бычьих аллели этих локусов или несколько короче оленьих (T530, T268, C273, T172, T193) или лежат в том же аллельном диапазоне (T156, C01). Из двух амплифицируемых у быка маркеров карibu (RT9 и RT24) отличия касаются локуса RT24, для которого показано мономорфное проявление и уменьшение размера ПЦР-продукта. Олений локус T507 у косуль проявляется более короткими аллелями по отношению к виду-источнику – разница составляет 53 п.н., тогда как у другого целевого вида – лося – дистанция в размерах аллелей не столь значительная – 19 п.н. Также более короткие аллели у косуль выявлены в оленьих локусах T501 и T108, у лосей такая особенность характерна для аллелей локусов T501, T172 и T108.

Олений локус T26, как у косули, так и у лося, проявляется по размерам аллелей аналогично с видом-источником. Все исследованные маркеры северного оленя сохраняют полиморфное проявление у лося и не отличаются у этого целевого вида по размерным диапазонам от вида-источника. У косуль из 4 амплифицируемых локусов карibu только локус RT30 проявляет полиморфизм и не имеет значительных отличий по своим размерам по сравнению с аллельными размерами вида-источника. Локусы RT6 и RT24 у косуль не полиморфны, в локусе RT9 выявлено только 2 аллеля и все 3 локуса характеризуются более короткими аллелями, чем у северного оленя. Наибольшие отличия в особенностях проявления маркеров карibu обнаружены у благородного оленя – три локуса из четырех амплифицируемых мономорфны и ПЦР-продукты всех локусов имеют более короткие размеры аллелей.

По данным польских исследователей [13], при использовании бычьих STR-маркеров для генотипирования ДНК европейского зубра аллельные размеры данных локусов у зубра в силу близкородственности этих двух видов укладываются в размерные диапазоны, показанные для быка. Данный факт позволяет в дальнейшем использовать размерные диапазоны, известные для быка, при сравнительном обсуждении генетических особенностей диких представителей семейства Полорогие с семейством Оленевые в составе подотряда Жвачные.

Заключение

Таким образом, для обитающих в Беларуси видов отряда Парнокопытные экспериментально показана смена статуса ряда STR-локусов с полиморфного (у видов-источников) на мономорфный или неамплифицируемый (у целевых видов), связанная с филогенетическими отношениями между видами (таксонами), отраженными в общей систематической классификации живых организмов. Так, уровень амплифицируемости бычьих локусов у косули и лося составляет 42/58%, оленьих – 92/92%, а локусов северного оленя – 80/100%. При этом полиморфными остаются у косули и лося только 17/25% бычьих локусов, 54/54% – оленьих локусов и от 60% (косуля) до 100% (лось) локусов северного оленя. Эксперимен-

тально подтверждены и количественно охарактеризованы также изменения размерных диапазонов аллелей при межтаксонном переносе маркеров.

Полученные результаты вписываются в общие тенденции перекрестных амплификаций, описанные в научной литературе [1, 2, 14–21]. Названные межтаксонные особенности видов отряда Парнокопытные делают возможным использование такой дифференциации между таксономическими единицами в идентификационных целях.

Список использованных источников

1. Erler, A. Development of Y-chromosomal microsatellite markers for nonhuman primates / A. Erler, M. Stoneking, M. Kayser // *Molecular Ecology*. – 2004. – Vol. 13. – P. 2921–2930.

2. Paetkau, D. The molecular-basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears / D. Paetkau, C. Strobeck // *Molecular Ecology*. – 1995. – Vol. 4. – P. 519–520.

3. Koskinen, M.T. Cross-species amplification of salmonid microsatellites, which reveal polymorphism in European and Arctic grayling, *Salmonidae: Thymallus* spp. / M.T. Koskinen, C.R. Primmer // *Hereditas*. – 1999. – Vol. 131. – P. 171–176.

4. PCR-based typing protocols // FBI Laboratory. – Washington, DC, 1994. – P. 4–9–4–28.

5. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 479 с.

6. Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls / G.A. Wilson [et al.] // *Mol. Ecol.* – 1997. – Vol. 6. – P. 697–699.

7. A set of 99 cattle microsatellites: characterisation, synteny mapping, and polymorphism / D. Vaiman [et al.] // *Mammalian Genome*. – 1994. – Vol. 5. – P. 288–297.

8. Kenneth, C.J. Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California Elk (*Cervus elaphus canadensis*) / C.J. Kenneth, F.L. Kenneth, J.D. Banks // *Molecular Ecology Notes* – 2002. – Vol. 2. – P. 425–427.

9. DNA Microsatellite Analysis for Parentage Control in Austrian Pigs / D. Nechtelberger

[et al.] // *Animal Biotechnology* – 2001. – Vol. 12, N 2. – P. 141–144.

10. Журина, Н.В. Изучение полиморфизма микросателлитных последовательностей ДНК крупного рогатого скота черно-пестрой породы / Н.В. Журина, Н.Н. Кузуб // Стратегия развития зоотехнической науки: тезисы докладов Междунар. научно-практ. конф., посвящ. 60-летию зоотехнической науки Беларуси, Жодино, 22–23 окт. 2009 г. / НАН Беларуси. РУП НПЦ НАНБ по животноводству; редкол. И.П. Шейко [и др.]. – Жодино, 2009. – С. 57–59.

11. Некоторые аспекты анализа микросателлитных локусов при проведении генетической экспертизы крупного рогатого скота / Т.И. Епишко, О.П. Курак, Н.Н. Кузуб // Современные методы генетики и селекции в животноводстве: материалы Междунар. науч. конф., Санкт-Петербург, 26–28 июн. 2007 г. / РАСХН. ВНИИГРЖ; редкол. П.Н. Прохоренко [и др.]. – СПб, 2007. – С. 255–260.

12. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations / T. Barabá [et al.] // *Molecular Ecology*. – 2007. – Vol. 16. – P. 3759–3767.

13. Polymorphism of bovine microsatellite DNA sequences in the lowland European bison / B. Gralak [et al.] // *Acta Theriol.* – 2004. – Vol. 49. – P. 449–456.

14. Andres, K. Applicability of anamid and galliform microsatellite markers to the genetic diversity studies of domestic geese (*Anser anser domesticus*) through the genotyping of the endangered zatorska breed / K. Andres, E. Kapkowska // *BMC Research Notes*. – 2011. – Vol. 4. – P. 65–74.

15. A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) / N. Navani [et al.] // *Animal Genetics*. – 2002. – Vol. 33. – P. 149–154.

16. Rogers, S.M. Isolation, characterization and cross-salmonid amplification of 31 microsatellite loci in the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*, Mitchill) / S.M. Rogers, M.H. Marchand, L. Bernatchez // *Molecular Ecology Notes*. – 2004. – Vol. 4. – P. 89–92.

17. Microsatellite multiplexes for high-throughput genotyping of French grunts (*Haemulon flavolineatum*, Pisces: *Haemulidae*)

- and their utility in other grunt species / D.A. Williams [et al.] // Molecular Ecology Notes. – 2004. – Vol. 4. – P. 46–48.
18. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification / C.R. Primmer [et al.] // Journal of Avian Biology. – 2005. – Vol. 36. – P. 348–360.
19. Cross-species test of 45 microsatellite loci isolated from different species of ungulates in the Iberian red deer (*Cervus Elaphus hispanicus*) to generate multiplex panel / B. Sanchez-Fernandez [et al.] // Mol. Ecol. – 2008 – Vol. 8 – P. 1378–1381.
20. Kühn, R. Transfer of bovine microsatellites to the cervine (*Cervus elaphus*) / R. Kühn [et al.] // Anim. Genet. – 2009 – Vol. 27 – P. 199–201.
21. Species cross-amplification, identification and genetic variation of 17 species of deer (*Cervidae*) with microsatellite and mitochondrial DNA from antlers / G.S. Hoffmann [et al.] // Mol. Biol. Rep. – 2015 – Vol. 42 – P. 1059–1067.

S.A. Kotova, A.A. Zablotskaya, E.A. Spivak, V.I. Rybakova, D.E. Nedzvedskaya, I.S. Tsybovsky

CROSS-AMPLIFICATION OF MICROSATELLITE DNA-MARKERS IN SPECIES POLYMORPHISM INVESTIGATIONS OF THE ORDER *ARTIODACTYLA*

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

This review presents the experimental studies of intertaxon molecular genetic differences of animal species in the order of *Artiodactyla*, which were received by use of specific STR-markers for the targeted DNA genotyping of taxonomically related species. The DNA of five species – moose, roe deer, wild boar, red deer and bull – were genotyped using 12 bovine, 6 porcine, 13 deer and 5 reindeer markers. As shown, the status of a number of STR-loci changed from polymorphic to monomorphic or non-amplified. Changes in the size ranges of alleles during the intertaxon transfer of markers were confirmed and quantified. The conclusion on the possibility of using such a differentiation among taxonomic units for identification purposes has been drawn.

Key words: microsatellites, *Artiodactyla*, wild animals, cross-amplification, polymorphism.

Дата поступления статьи 4 января 2017 г.

Р.А. Кулибаба, Ю.В. Ляшенко

К ВОПРОСУ ОБ ОБРАЗОВАНИИ КОНФОРМАЦИОННЫХ ХИМЕРНЫХ МОЛЕКУЛ В ПРОЦЕССЕ АМПЛИФИКАЦИИ ДИНУКЛЕОТИДНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ

Институт животноводства Национальной академии аграрных наук Украины
62404, Украина, Харьковская обл., Харьковский р-н, пгт. Кулинич, ул. 7-ой Гвардейской армии, 3
e-mail: romankx@rambler.ru

Изучен вопрос образования особого класса конформационных артефактов в процессе амплификации динуклеотидных микросателлитных локусов. Показано, что возникновение нелинейной гомодуплексной ДНК характерно для большого количества динуклеотидных микросателлитных локусов разных видов животных: как для *Gallus gallus* (MCW0104, LEI0094, MCW0123, MCW0245, MCW0034), так и для *Bos taurus* (RM185, VM027). Доказано, что причиной образования данного типа артефактов ПЦР при амплификации целевых фрагментов генома является непосредственное взаимодействие антипараллельных цепей молекулы ДНК, а не ошибки ДНК-полимеразы. Выявлена зависимость образования нелинейной гомодуплексной ДНК от концентрации амплифицированных фрагментов. Показано, что образование нелинейной гомодуплексной ДНК в концентрации, достаточной для детекции при проведении электрофореза, происходит, ориентировочно, с 20–25-го цикла ПЦР.

Ключевые слова: генотипирование, микросателлиты, полиморфизм, электрофорез, артефакты.

Введение

Благодаря особенностям своей структуры (в первую очередь высокой полиморфности локусов) микросателлиты нашли применение для решения самых различных задач современной генетики [1–3]. К первоочередным задачам относятся идентификация особей, контроль происхождения, генетико-популяционный анализ, контроль за проведением селекционной работы и т.д. [4, 5]. При проведении достаточно масштабных работ по типированию особей, как по отдельным микросателлитным маркерам, так и по их совокупности, основное внимание следует уделять точности генотипирования, т.е. необходимости избегать путаницы при идентификации аллелей и генотипов. В связи с этим актуальным является вопрос о влиянии целого ряда факторов на эффективность генотипирования. Следует отметить, что для микросателлитов характерно наличие артефактов, возникновение которых связано с особенностями данного типа молекулярно-генетических маркеров [6]. Артефакты проявляются в виде образования дополнительных, т.е. не соответствующих целевым, фрагментов ДНК, наличие которых может приводить к ошибкам при генотипировании особей (как пример, увели-

чивается риск путаницы гомозиготных особей с гетерозиготными, со всеми вытекающими отсюда последствиями). К большинству достаточно хорошо изученных артефактов относятся статтеры, нуль-аллели, гетеродуплексная ДНК и т.д. [7–9]. Многие из перечисленных артефактов возникают и при генотипировании по другим типам молекулярно-генетических маркеров (PCR-RFLP, Indel и т.д.). Однако, несмотря на изученность данных феноменов, все равно отмечены случаи неверных интерпретаций наблюдаемых явлений (хорошим примером может служить ошибка в принятии наличия гетеродуплексной ДНК за факт дубликации гена при амплификации фрагмента четвертого интрона гена гормона роста кур) [10]. Подобное явление особенно широко распространено при проведении микросателлитного анализа, о чем свидетельствует детальный анализ фотографий электрофореграмм, представленных в различных публикациях. В предыдущей работе авторами было постулировано наличие особого класса артефактов ПЦР, присущих только микросателлитным локусам, – нелинейной гомодуплексной ДНК [11]. Нелинейная гомодуплексная ДНК относится к классу конформационных химерных молекул и представляет

собой антипараллельные цепи целевых фрагментов, которые комплементарны друг другу не на всем протяжении цепи. Некомплементарный участок (петлевой домен) стабилизируется взаимодействиями внутри одиночной цепи. Образование нелинейной гомодуплексной ДНК в процессе ПЦР приводит к появлению на электрофореграмме дополнительных фрагментов (полос), которые значительно затрудняют генотипирование (в первую очередь, приводя к появлению ложных аллелей и к мнимому увеличению гетерозиготности в изучаемой популяции). Предлагаемая статья служит своеобразным продолжением данных исследований. Цель работы – детальное изучение динамики образования нелинейной гомодуплексной ДНК в процессе амплификации целевых фрагментов динуклеотидных микросателлитных локусов, а также подтверждение природы образования артефактов ПЦР посредством конформационных взаимодействий между цепями ДНК.

Материалы и методы

Исследования проводили в лаборатории профилактики заболеваний птицы и молекулярной диагностики Государственной опытной станции птицеводства, а также в лаборатории молекулярно-генетических и физиолого-биохимических исследований в животноводстве Института животноводства Национальной академии аграрных наук Украины.

В качестве источника биологического материала использовали кровь животных (крупный рогатый скот украинской черно-пестрой породы) и птицы (куры пород украинской селекции). ДНК выделяли с использованием коммерческого набора реагентов «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», Россия).

Для проведения амплификации в серии опытов по изучению конформационного полиморфизма ДНК использовали следующие праймеры:

MCW0104 – 5'-TAGCACAACCTCAAGCTGTGAG-3' и 5'-AGACTTGCACAGCTGTGACC-3' [12].

MCW0034 – 5'-TGCACGCACTTACATCTTAGAGA-3' и 5'-TGTCCTTCCAATTACATTCATGGG-3' [12].

Амплификацию проводили с использованием реагентов DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific) с использованием программируемого

термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по соответствующим программам: 1 цикл – денатурация: 94 °С, 3 мин; 35 циклов – денатурация: 94 °С, 1 мин, отжиг: 1 мин (67 °С), элонгация: 72 °С, 1 мин; 1 цикл – финальная элонгация: 72 °С, 10 мин. Объем конечной смеси составлял 20 µL, концентрация праймеров – 0,2 µM в каждом случае.

Электрофорез проводили в полиакриламидных гелях различных концентраций (4–8%) как нативных, так и денатурирующих. Окрашивание гелей проводили с использованием бромистого этидия или нитрата серебра [13].

Исследования проводились как на целевых фрагментах, так и на выделенной из геля ДНК. Выделение фрагментов ДНК из ПААГ проводили посредством инкубирования вырезанных из геля фрагментов в присутствии ТЕ-буфера в течение 16 часов при 37 °С [14]. Секвенирование осуществляли на автоматическом анализаторе ABI Prism 3130.

Результаты и обсуждение

Для достижения поставленных задач исследования в целом были разделены на несколько последовательных этапов. На первом этапе мы повторили опыты, проведенные нами в предыдущие годы, на большем количестве различных микросателлитных маркеров. Нами было показано образование артефактов (нелинейной гомодуплексной ДНК) в процессе ПЦР по локусам MCW0104, LEI0094, MCW0123, MCW0245, MCW0034. Также данное явление было подтверждено исследованиями не только на птице, но и на крупном рогатом скоте – маркеры RM185 и BM027 (рис. 1).

В каждом случае при амплификации как нативных ДНК-мишеней, так и выделенных из геля одиночных целевых фрагментов, после проведения электрофореза в нативных гелях мы наблюдали образование дополнительных фрагментов, что существенным образом затрудняло генотипирование особей. Игнорирование вопроса об образовании артефактов в процессе ПЦР могло привести к неверным выводам и искажениям в генетико-популяционном анализе опытных групп животных. Факт широко распространенного образования артефактов при типировании по большому количеству микросателлитных локусов приводит нас ко второй задаче исследований – показать, что

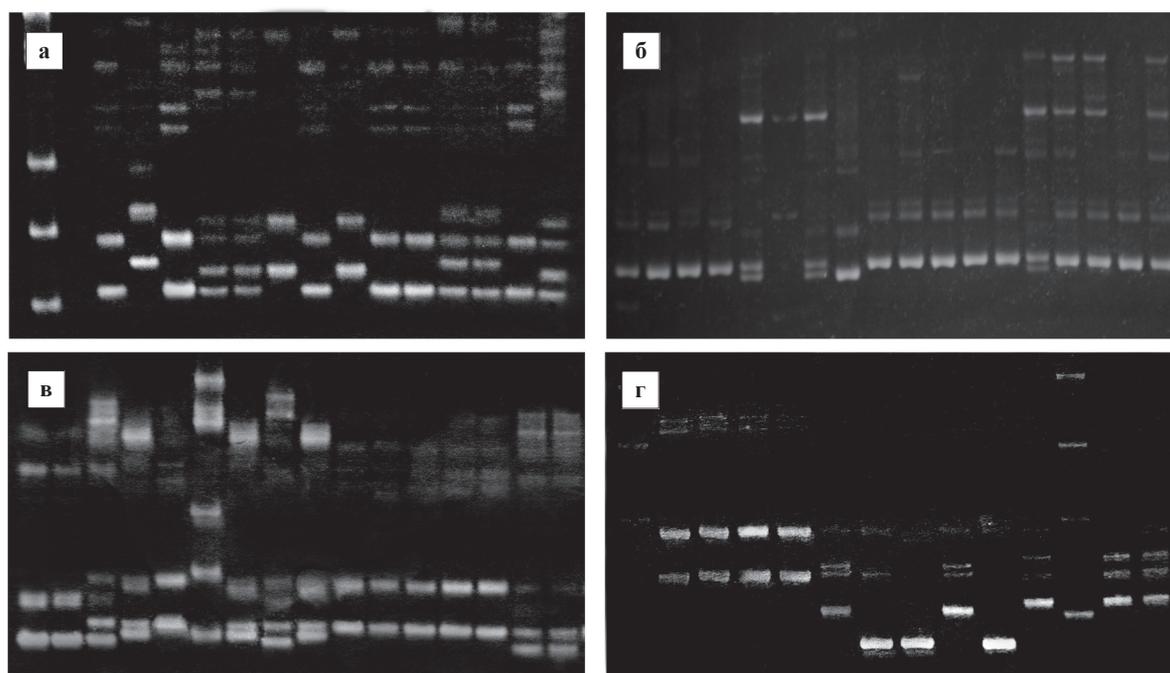


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов амплификации различных микросателлитных локусов: а – LEI0094; б – BM027; в – MSW0123; г – MSW0104. А, в, г – окрашивание нитратом серебра; б – окрашивание бромидом этидия

непосредственным источником образования артефактов являются конформационные взаимодействия цепей ДНК.

Как известно, использование нативных полиакриламидных гелей позволяет разделять молекулы по размеру, однако на электрофоретическую подвижность разделяемых фрагментов также влияет и конформационная структура. Для предотвращения данного эффекта широко применяют денатурирующие условия электрофореза в геле. При использовании денатурирующего ПААГ молекулы ДНК разделяются только в зависимости от их размера (количества пар нуклеотидов), конформационные эффекты сведены к минимуму. Исходя из вышеизложенного, был поставлен опыт с целью проверки разделяющей способности денатурирующего ПААГ на примере амплифицированных фрагментов с ярко выраженным конформационным полиморфизмом в нативных условиях. На рис. 2 представлены фотографии электрофореграмм нативного (за основу взята фотография из нашей предыдущей работы [11]) и полностью продублированного по пробам денатурирующего геля.

Анализ приведенных электрофореграмм свидетельствует об исчезновении дополнительных фрагментов в случае с денатурирую-

щим ПААГ. Это доказывает, что природа этих фрагментов связана с конформационными взаимодействиями.

Убедительные выводы, полученные в результате описанных экспериментов, могут натолкнуть на мысль, что повсеместное использование денатурирующих гелей вместо нативных может полностью решить проблему с эффективностью генотипирования по микросателлитным маркерам. Такой вывод вполне логичен, однако данный метод также имеет ряд недостатков. Так, например, к недостаткам использования денатурирующих гелей относится необходимость (о которой, впрочем, весьма часто забывают) поддержания постоянной температуры (как правило, 50–60 °С) в течение всего электрофореза. Для этого следует использовать электрофоретические камеры с возможностью рециркуляции буфера, которыми оснащена далеко не каждая лаборатория. При игнорировании данного условия не будут достигнуты необходимые параметры геля, способствующие полному обеспечению денатурирующих условий проведения электрофореза, что, в свою очередь, приведет к появлению конформационных химерных молекул (нелинейной гомодуплексной ДНК) и, соответственно, к ошибкам геноти-

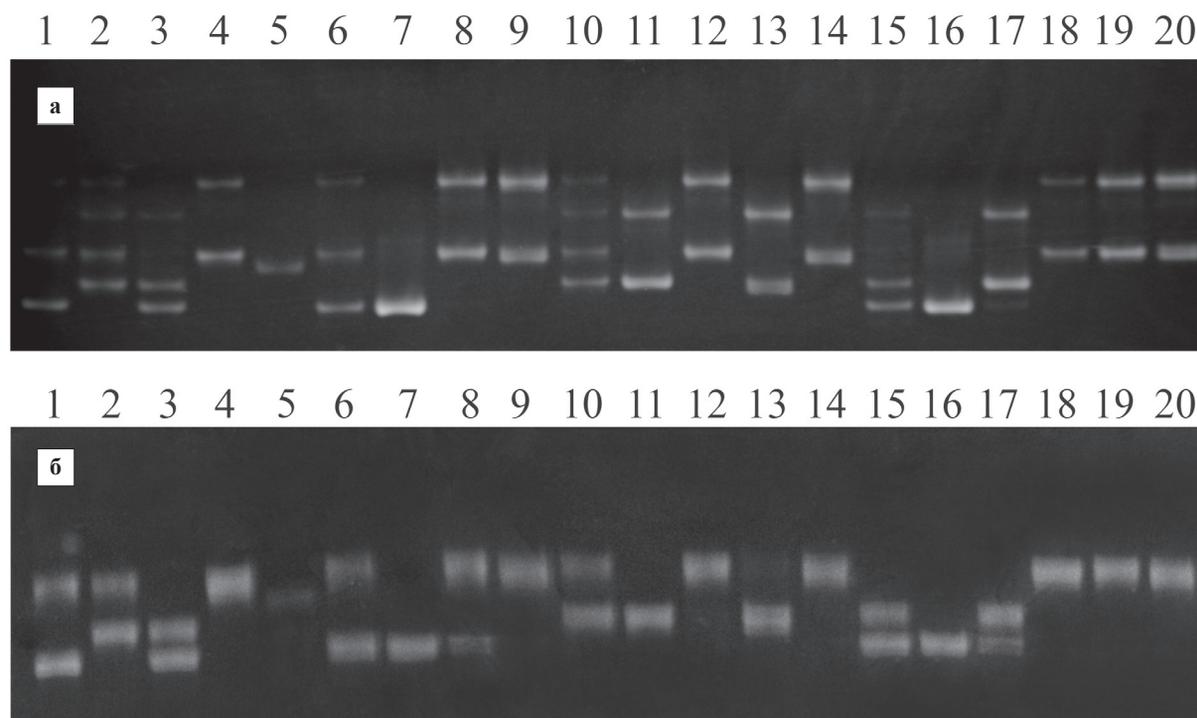


Рис. 2. Сравнение нативного (а) и денатурирующего (б) ПААГ. 1–20 – номера проб (пояснения в тексте).

Электрофореграмма, представленная на рис. 1а, взята из статьи [11].

1–4, 6, 10, 15, 18 – нативные пробы; 7–9, 11–14, 16, 17, 19, 20 – амплификат от выделенных целевых фрагментов соответствующих нативных проб; 5 – маркер молекулярных масс М-200 (фрагмент 200 п.н.). Гель а окрашен бромидом этидия, гель б – нитратом серебра

пирования. Необходимо также отметить, что комбинация таких факторов, как высокая температура, высокая концентрация мочевины в геле (7–8 М) усложняет процедуру внесения проб в гель, а также увеличивает диффузию амплифицированных фрагментов. Это является существенным недостатком при идентификации аллелей, отличающихся на несколько пар оснований. Применение более концентрированных гелей для усиления разрешающей способности также малоэффективно в связи с увеличением времени форега (усиление диффузии с увеличением времени прогонки и необходимостью использования повышенных параметров электрического поля). В связи с этим, повсеместное использование электрофореза в денатурирующем ПААГ не является панацеей, а наоборот, зачастую служит источником большого количества ошибок.

На следующем этапе исследований была поставлена задача продемонстрировать тот факт, что источник образования нелинейной гомодуплексной ДНК – непосредственное взаимодействие цепей в двухцепочечной молекуле, а

не результат ошибок ДНК-полимеразы в процессе амплификации при проведении ПЦР. С этой целью были проведены эксперименты по воспроизведению артефактов без проведения ПЦР с использованием в качестве модельного объекта локуса MSW0034. Для этого, после проведения амплификации, из геля были вырезаны фрагменты А и В (рис. 3) для последующего выделения ДНК.

Одна часть (фрагменты А и В) была подготовлена для проведения электрофореза без изменений (пробы 2 и 3), вторую подвергли денатурации при 94 °С в течение 5 мин с дальнейшим термостатированием при комнатной температуре в течение 20 мин (пробы 4 и 5). Данной процедуры достаточно для обеспечения обратимой денатурации выделенной из геля ДНК и последующей гибридизации комплементарных цепей друг с другом. Далее все пробы переносили на электрофорез (нативный).

Как видно на электрофореграмме, пробы 2 и 3 представлены в виде лишь одного целевого фрагмента (А или В). Проведение цикла денату-

рации/ренатурации привело к появлению двух фрагментов (А и В) в пробах 4 и 5. Тот факт, что в пробах 4 и 5 присутствуют два фрагмента (целевой и дополнительный), убедительно указывает на специфическое взаимодействие комплементарных цепей как непосредственную причину образования артефактов (нелинейной гомодуплексной ДНК). Так как вышеприведенная процедура представляет собой, по сути, один из этапов ПЦР (с измененными характеристиками длительности каждого из процессов), то становится понятным, что практически в каждом цикле амплификации могут образовываться, наряду с целевыми фрагментами, нелинейные гомодуплексные молекулы.

Также параллельно провели секвенирование вырезанных из геля амплифицированных фрагментов. На рис. 4 представлены нуклеотидные последовательности двух вырезанных фрагментов ДНК локуса MCW0034 (фрагменты А и В рис. 3).

На приведенном рисунке показаны фрагменты локуса MCW0034, непосредственно содержащие микросателлитный мотив, т.к. именно вариации в количестве элементов мотива и определяют различия в аллелях. В данном случае это динуклеотидный мотив СА. Проведение процедуры выравнивания нуклеотидных фрагментов позволяет сделать вывод об идентичности двух исследованных последовательностей (количество элементов мотива совпадает) (рис. 4). Тот факт, что идентичные аллели MCW0034 дают разные фрагменты на электрофореграмме, убедительно доказывает правильность предположения о возникновении в процессе амплификации микросателлитных локусов нелинейной гомодуплексной ДНК как своего рода конформационной химерной молекулы.

Полученные результаты коррелируют с данными других авторов, изучавших различные конформационные состояния ДНК, содержа-

щие тринуклеотидные повторы [15]. Речь идет о так называемой Slipped-stranded DNA. По мнению авторов, данные образования возникают в результате своего рода «проскальзывания» (slippage) цепей ДНК друг относительно друга, что и приводит к образованию конформационных химерных молекул [16]. Описываемый феномен достаточно широко распространен и, по сути, является основой так называемой

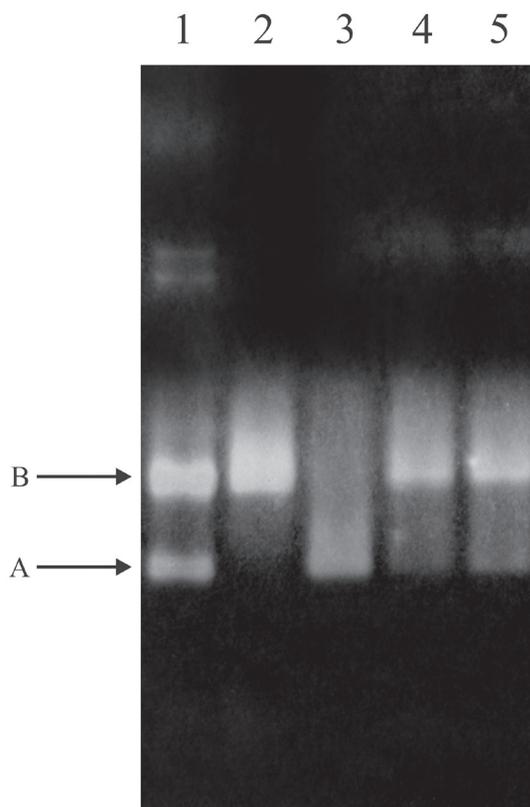


Рис. 3. Электрофореграмма целевых продуктов амплификации и нелинейной гомодуплексной ДНК: 1 – исходная амплифицированная последовательность; 2 – выделенный из геля фрагмент А (нативный); 3 – выделенный из геля фрагмент В (нативный); 4 – фрагмент А, подвергнутый циклу денатурация/ренатурация; 5 – фрагмент В, подвергнутый циклу денатурация/ренатурация

```

80.....
A  GTATGACASCAATGACACACACACACACACACACACACACACACACACACAG
      ^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^
80.....
B  GTATGACASCAATGACACACACACACACACACACACACACACACACACACAG
      ^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^

```

Рис. 4. Фрагмент нуклеотидных последовательностей микросателлитного локуса MCW0034: А – амплифицированный вырезанный нижний фрагмент; В – амплифицированный вырезанный верхний фрагмент. Подстрочной чертой выделен динуклеотидный мотив

«микросателлитной нестабильности», которую связывают с различными генетическими заболеваниями [17]. Явление «проскальзывания» ДНК во время репликации молекулы приводит к образованию статтеров – амплифицированной ДНК, содержащей измененное количество единиц повтора микросателлитной последовательности (как инсерции, так и делеции). Данное явление может иметь место и при амплификации микросателлитных локусов в процессе ПЦР, что приведет к возникновению дополнительных фрагментов (по сути – аллелей) на электрофореграммах [18]. Однако следует отметить, что образование статтеров – процесс вероятностный и происходит далеко не при каждой амплификации. В процессе изучения генетической структуры популяций кур украинской селекции (4 породы по 10 SSR-локусам) мы лишь единожды столкнулись с образованием статтеров в процессе ПЦР (локус MSW0104). Выявленный амплификационный фрагмент характеризовался слабой интенсивностью свечения на электрофореграмме и отличался от целевого аллеля ориентировочно на 2 п.н. (делеция). Достоверность его образования была подтверждена результатами денатурирующего гель-электрофореза. Если предположить, что процесс «проскальзывания» ДНК-полимеразы в микросателлитной последовательности является событием относительно редким, то количество копий статтеров в процессе амплификации должно быть более низким в сравнении с целевыми фрагментами. Поэтому при традиционных способах детекции (бромид этидиума или азотнокислое серебро) мы их либо не улавливаем, либо же имеет место относительно слабое свечение, которое позволяет принимать их за ложные аллели. Артефакты, в случае образования статтеров, представляют собой, по сути, гетеродуплексную ДНК, т.е. гибридную молекулу, состоящую из цепей разной длины (различающихся на одну или несколько единиц микросателлитного повтора). Такой тип артефактов называется SI-DNA (Slipped Intermediates DNA) [15]. Название данного типа артефактов отражает механизм их образования – эффект «проскальзывания» (slippage). В случае отсутствия статтеров гибридные молекулы полностью идентичны описанной в нашей работе нелинейной гомодуплексной ДНК, что доказывается результатами

секвенирования последовательностей (равное количество элементов микросателлитного мотива указывает на идентичность аллелей и, следовательно, отсутствие статтеров) (рис. 4). Однако авторы называют подобные структуры, в случае с тринуклеотидными повторами, S-DNA, т.е. Slipped DNA, что, с нашей точки зрения, несколько нецелесообразно, т.к. предполагает феномен «проскальзывания» как механизм образования мутантных вариантов исходного мотива. Поэтому использование термина «нелинейная гомодуплексная ДНК», на наш взгляд, больше подходит для данного типа артефактов, так как непосредственно указывает на конформационную природу их образования.

Предположение о том, что в процессе ПЦР наряду с целевыми образуются фрагменты нелинейной гомодуплексной ДНК, послужило причиной последующих исследований – изучения вопроса о влиянии количества циклов ПЦР на появление неспецифических продуктов (артефактов).

Для решения данной задачи провели серию амплификаций с последующим разделением продуктов в нативном ПААГ. Амплификации различались между собой только количеством циклов – от 5 до 35 с шагом 5. На рис. 5 представлены результаты опыта с использованием пробы ДНК, соответствующей № 4 рис. 2.

Как видно из рис. 5, артефакты появляются, начиная, ориентировочно, с 20-го цикла. В пределах первых 15 циклов синтезируются преимущественно целевые фрагменты. Начиная с 20–25-го циклов интенсивность свечения артефактов увеличивается вплоть до совпадения по значению с целевыми фрагментами, что указывает на приблизительно равный «выход» продуктов. С увеличением количества циклов ПЦР происходит увеличение концентрации продуктов амплификации (при условии совпадения эффективности реакций в целом). Поэтому появление артефактов после первых 20 циклов указывает на зависимость их образования от концентрации амплифицированных фрагментов. В определенной степени на конечный результат могут также влиять такие факторы, как исходная концентрация матрицы ДНК, модель термоциклера и т.д., что, в свою очередь, также выражается в вариации эффективности ПЦР, т.е. в целом, опять-таки влияет на концентрацию конечного продукта. Однако

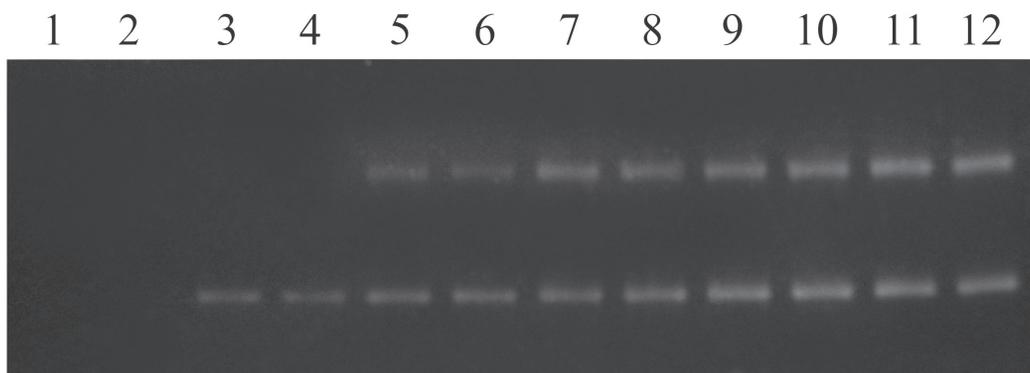


Рис. 5. Зависимость образования артефактов (нелинейных гомодуплексов) от количества циклов ПЦР: 1 – 5 циклов; 2 – 10; 3–4 – 15; 5–6 – 20; 7–8 – 25; 9–10 – 30; 11–12 – 35

зависимость образования именно «конформационных» артефактов от концентрации амплифицированных продуктов (ампликонов), на наш взгляд, очевидна.

Следует отметить, что возможность определения дополнительных фрагментов на электрофореграмме зависит также и от метода окрашивания геля. В случае использования окрашивания нитратом серебра (как гораздо более чувствительного метода) образование артефактов определяется, в среднем, с 15 циклов ПЦР.

На основе всего вышеизложенного можно предположить, что в условиях относительно низких концентраций амплифицированной ДНК происходит образование преимущественно целевых фрагментов (линейной гомодуплексной ДНК), т.к. в циклах денатурации/ренатурации антипараллельные цепи комплементарно связываются друг с другом на всем протяжении и вероятность образования артефактных молекул низка и недостаточна для последующей детекции. В случае же, когда концентрация амплифицированной ДНК превышает определенное пороговое значение, комплементарные взаимодействия цепей на всем протяжении дуплексной молекулы нарушаются, что и приводит к образованию нелинейной гомодуплексной ДНК. Особого внимания заслуживает тот факт, что наблюдаемый феномен характерен только для микросателлитных локусов. Возможно, что стабилизация молекулы нелинейной гомодуплексной ДНК происходит именно из-за взаимодействия оснований внутри каждой из цепей в участке, содержащем микросателлитные повторы. В любом случае, более детальное освещение

данного вопроса, особенно касающегося влияния количества и состава микросателлитных повторов на эффективность образования конформационных химер, требует проведения дальнейших детальных экспериментов, которые, в свою очередь, будут служить продолжением представленных в работе исследований.

Заключение

Приведенные результаты исследований акцентируют внимание на особом классе артефактов ПЦР, возникающих в результате конформационных изменений структуры ДНК при амплификации динуклеотидных микросателлитных локусов. Речь идет о нелинейных гомодуплексных молекулах, имеющих близкую к целевым фрагментам электрофоретическую подвижность и, следовательно, существенно влияющих на эффективность генотипирования при использовании нативных ПААГ. На примере представленных экспериментальных данных подтвержден механизм образования нелинейной гомодуплексной ДНК посредством взаимодействия цепей молекулы, а не в результате ошибок ДНК-полимеразы при проведении амплификации. Показана зависимость образования конформационных артефактов от концентрации амплифицированных фрагментов в процессе ПЦР. Вероятность образования нелинейных гомодуплексов существенно возрастает после первых 20 циклов амплификации, и к финальному циклу ПЦР (35 циклов) их количество соизмеримо с выходом целевых фрагментов.

Конформационная природа данного типа артефактов подтверждена также в опыте с использованием денатурирующих условий элек-

трофореза (дополнительные фрагменты отсутствуют при использовании денатурирующего ПААГ). Казалось бы, повсеместное использование денатурирующего гель-электрофореза решает проблемы со всевозможными разновидностями дуплексных молекул ДНК и избавляет исследователя от ошибок при генотипировании. Однако, как следует из анализа электрофореграмм, приведенных в различных научных публикациях, далеко не всегда удается достичь полностью денатурирующих условий при проведении электрофореза, что впоследствии и приводит к ошибками генотипирования. Поэтому лучший способ избавления от возможных ошибок – детальный анализ полученных результатов и понимание природы происходящих процессов. В этой работе мы попытались разобраться в сути процесса образования наиболее распространенного типа артефактов при анализе микросателлитных локусов различных видов животных. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности проведения предварительного анализа именно в нативных условиях, чтобы представить в целом картину полиморфизма изучаемых особей и обратить внимание на возможные артефакты, что, безусловно, поможет при анализе данных в денатурирующих условиях. При получении определенного опыта с помощью анализа гомо- и гетеродуплексных фрагментов можно проводить успешные генотипирования без обязательного проведения денатурирующего гель-электрофореза, который в отсутствие специального оборудования трудно воспроизводим и не лишен недостатков.

Список использованных источников

1. Chistiakov D.A. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics / D.A. Chistiakov, B. Hellemans, F.A.M. Volckaert // *Aquaculture*. – 2006. – Vol. 255. – P. 1–29.
2. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants / R.K. Kalia [et al.] // *Euphytica*. – 2011. – Vol. 177. – P. 309–334.
3. Methods for development of microsatellite markers: an overview / S. Senan [et al.] // *Not Sci Biol*. – 2014. – Vol. 6 (1). – P. 1–13.
4. Gholizadeh, M. Use of microsatellite markers in poultry research / M. Gholizadeh, G.R. Mianji // *International Journal of Poultry Science*. – 2007. – Vol. 6 (2). – P. 145–153.
5. Abdul-Muneer, P.M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies / P.M. Abdul-Muneer // *Genetics Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – 11 p. – ID 691759.
6. Butler, J.M. Forensic DNA Typing, Second Edition: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers / J.M. Butler. – Academic Press, 2005. – 688 p.
7. Walsh, P.S. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA / P.S. Walsh, N.J. Fildes, R. Reynolds // *Nucleic acids research*. – 1996. – Vol. 24, N 14. – P. 2807–2812.
8. Olejniczak, M. Genotyping of simple sequence repeats – factors implicated in shadow band generation revisited / M. Olejniczak, W.J. Krzyzosiak // *Electrophoresis*. – 2006. – Vol. 27. – P. 3724–3734.
9. Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the Arabian Oryx / I.A. Arif [et al.] // *Genetics and Molecular Research*. – 2010. – Vol. 9 (1). – P. 259–265.
10. Кулибаба, Р.А. MspI-полиморфизм четвертого интрона гена гормона роста в популяциях кур различных пород. Анализ причин возникновения дополнительного паттерна рестрикции / Р.А. Кулибаба, П.С. Юрко, Ю.В. Ляшенко // *Цитология и генетика*. – 2015. – Т. 49, № 6. – С. 30–37.
11. Кулибаба, Р.А. Влияние артефактов ПЦР на эффективность генотипирования по микросателлитным локусам при использовании электрофореза в нативных полиакриламидных гелях / Р.А. Кулибаба, Ю.В. Ляшенко // *Цитология и генетика*. – 2016. – Т. 50, № 3. – С. 16–23.
12. Molecular genetic characterization of animal genetic resources / FAO Animal Production and Health Guidelines. – N 9. – Rome, 2011. – 87 p.
13. Irwin N., Janssen K.A. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press; 3th edition. 2001. 764 p.
14. Efficient detection, quantification and enrichment of subtle allelic alterations / J. Chen [et al.] // *DNA Research*. – 2012. – Vol. 19. – P. 423–433.

15. Pearson, C.E. Trinucleotide repeat DNA structures: dynamic mutations from dynamic DNA / C.E. Pearson, R.R. Sinden // *Current Opinion in Structural Biology*. – 1998. – Vol. 8 – P. 321–330.

16. Pearson C.E. Alternative structures in duplex DNA formed within the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy and fragile X loci / C.E. Pearson, R.R. Sinden // *Biochemistry*. – 1996. – Vol. 35. – P. 5041–5053.

17. Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA / R.R. Sinden [et al.] // *J. Biosci.* – 2002. – Vol. 27, No 1, Suppl. 1. – P. 53–65.

18. Microsatellite (SSR) amplification by PCR usually led to polymorphic bands: evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands / A. Hosseinzadeh-Colagar [et al.] // *Molecular biology research communications*. – 2016. – Vol. 5 (3). – P. 167–174.

R.A. Kulibaba, Y.V. Liashenko

ON THE ISSUE OF GENERATION OF CONFORMATIONAL CHIMERIC MOLECULES DURING AMPLIFICATION OF DINUCLEOTIDE TANDEM REPEATS

Institute of Animal Science of National academy of agrarian sciences of Ukraine
Kharkov, Ukraine, 62404

The issue related to the formation of a special class of conformational artifacts during the amplification of dinucleotide microsatellite loci was studied. It was shown that the origin of a non-linear homoduplex DNA molecule is typical for a large number of dinucleotide microsatellite loci of different animal species – for *Gallus gallus* (MCW0104, LEI0094, MCW0123, MCW0245, MCW0034 et al.), and for *Bos taurus* (RM185, BM027). It is proved that a cause of this type of PCR artifacts' formation during the amplification of target fragments of a genome is rather direct interaction of the antiparallel chains of the DNA molecule than errors of the DNA polymerase. The relation between the formation of a non-linear homoduplex DNA and the concentration of the amplified fragments was defined. It is shown that the formation of the non-linear homoduplex DNA in the concentration, sufficient for the detection during electrophoresis, occurs approximately from 20-25th PCR cycle.

Key words: genotyping, microsatellite, polymorphism, electrophoresis, artifacts.

Дата поступления статьи 27 октября 2016 г.

М.С. Родькин¹, О.Д. Левданский¹, В.С. Панкратов¹, Д.Е. Данилов²

ПОЛИМОРФНЫЕ ЛОКУСЫ ss469415590 ГЕНА *IFNL4* И rs12979860 ГЕНА *IL-28B* В РОЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ БЕЛОРУССКИХ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: m.rodzkin@gmail.com

²УО «Белорусский государственный медицинский университет»

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

В Республике Беларусь вирусом гепатита С инфицирован 1% населения. В мире каждый год от осложнений, вызванных данным заболеванием, умирают до 700 тыс. человек. Существуют методы лечения вирусного гепатита С, включающие препараты пегилированного интерферона и рибавирина, при этом ответ на терапию во многом определяется генотипом пациента. Нами получены данные, что однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) rs12979860 гена *IL-28B* является надежным предиктором эффективности лечения для белорусских пациентов. В свою очередь, полиморфный локус ss469415590 гена *IFNL4* обладает сопоставимой с локусом гена *IL-28B* прогностической силой и даже незначительно ее превосходит.

Ключевые слова: гепатит С, генетические предикторы, rs12979860, ss469415590.

Введение

Гепатит С представляет собой тяжелое вирусное заболевание, передающееся главным образом парентеральным путем. В мире до 700 тыс. человек погибают каждый год от осложнений, вызванных болезнью. В Республике Беларусь вирусом гепатита С инфицировано (ВГС) около 1% населения [1].

Возбудитель заболевания принадлежит к семейству *Flaviviridae* и является оболочечным РНК-содержащим инфекционным агентом. Основными клетками-мишенями для вирионов являются гепатоциты, однако кроме них вирус также способен проникать в В-клетки, дендритные и другие типы клеток. Жизненный цикл ВГС полностью протекает в цитоплазме [2].

Крайне высокая генетическая пластичность инфекционного агента обуславливает существование 7 генотипов вируса, в свою очередь, дробящихся на несколько десятков подтипов [3]. В Республике Беларусь самым распространенным является подтип 1b, детектируемый чуть более чем в половине всех случаев гепатита С [4, 5].

По мере развития осложнений заболевания лишь у 15% пациентов развиваются неспецифические симптомы, у большинства же болезнь

протекает бессимптомно. Первые шесть месяцев после инфицирования принято считать острой фазой гепатита С. По окончании этого периода существует два варианта разрешения болезни. Первый из них подразумевает полное самоизлечение организма за счет сил собственной иммунной системы. При втором варианте, который наблюдается у 85% инфицированных, элиминации возбудителя не происходит, и болезнь перетекает в хроническую фазу [6, 7]. Хронический вирусный гепатит С (ХВГС) может длиться годами и даже десятилетиями, приводя в итоге к тяжелым поражениям, таким как гепатоцеллюлярная карцинома и цирроз печени [8, 9].

В борьбе против ВГС задействованы как неспецифические механизмы защиты иммунной системы, представленные активностью различных иммунокомпетентных клеток, так и специфические, за счет действия CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Первой линией обороны против инфекционного агента выступает интерфероновый ответ, выражающийся в выработке молекул интерферонов различных типов. Последние запускают транскрипцию многочисленных интерферон-стимулируемых генов (ISGs), продукты которых оказывают прямое или опосредованное противовирусное действие [10, 11].

Одним из возможных вариантов терапии гепатита С являются препараты пегилированного интерферона- α (ПегИФН α) и рибавирина (RBV). Однако такое лечение оказывается эффективным лишь в 50% случаев среди пациентов с ХВГС 1 генотипа [12–14]. Поэтому крайне важным является поиск методов предварительной оценки эффективности этиотропной терапии заболевания указанными препаратами. На пациентах европейского происхождения было обнаружено, что rs12979860 гена *IL-28B* и ss469415590 гена *IFNL4* ассоциированы с достижением устойчивого вирусологического ответа (УВО) [15–26].

Целью нашей работы являлась оценка связи полиморфных локусов rs12979860 гена *IL-28B* и ss469415590 гена *IFNL4* с ответом на лечение белорусских пациентов с ХВГС 1 генотипа препаратами пегилированного интерферона и рибавирина.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 130 человек, прошедших курс лечения от ХВГС 1 генотипа препаратами пегилированного интерферона в сочетании с рибавирином. Тотальная ДНК была выделена фенол-хлороформным методом из клеток буккального эпителия. Все пациенты прошли генетическое тестирование по локусу rs12979860 гена *IL-28B*, 127 из них – по локусу ss469415590 гена *IFNL4*. Из пациентов были сформированы две группы. Первая насчитывала 81 человек (79 – в случае локуса гена *IFNL4*) со следующими критериями эффективности лечения: отсутствие ответа, частичный ответ, вирусологический прорыв и рецидив. Данные критерии были приняты в качестве показателей неэффективности примененного лечения. Вторую группу составили

49 человек (48 – в случае локуса гена *IFNL4*) с устойчивым вирусологическим ответом по истечении терапии, что было расценено как показатель успешности противовирусного лечения гепатита С. Для оценки популяционных частот генотипов и аллелей в локусах rs12979860 и ss469415590 также было проведено генетическое тестирование 596 и 300 человек, соответственно, проживающих в различных регионах Беларуси. Генотипирование исследуемых выборок по локусу rs12979860 гена *IL-28B* проводили методом ПЦР-ПДРФ-анализа, по локусу ss469415590 гена *IFNL4* – методом ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan-зондов (табл. 1).

Полиморфный участок гена *IL-28B* амплифицировали в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 30–40 нг геномной ДНК, 1,5 мкл 10 \times буфера (750 ммоль/л Tris-HCl (pH = 8,8), 200 ммоль/л (NH₄)₂SO₄, 0,1% Тритон X-100, 10 ммоль/л Тартразин, 5% Фикол 400), 0,8 мкл 25 мМ MgCl₂, 1,5 мкл 2,5 мкМ смеси четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ), 0,2 мкл (5 ед./мкл) ДНК-полимеразы *Taq* (Dialat, Россия), по 0,5 мкл (10 пкмоль/мкл) каждого праймера, 8 мкл стерильной деионизированной воды.

Продукт амплификации участка гена *IL-28B* размером 238 п.н. подвергли ферментативному гидролизу с помощью рестриктазы *Bst*UI (*Bsh*1236I) согласно протоколу фирмы-производителя (Fermentas, Литва). Идентификацию рестрикционных фрагментов проводили в 8%-ном полиакриламидном геле (рис. 1) с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия (10 мг/мл). Результаты электрофоретического разделения фрагментов детектировали в УФ-свете с помощью системы для гель-документирования Vilber Lourmat.

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидов

Полиморфный локус / тип олигонуклеотидов	Нуклеотидная последовательность
rs12979860 / праймеры	F: 5' – CGCTTATCGCATACGGCTAGG – 3' R: 5' – CAGGGTCAATCACAGAAGGGAG – 3'
ss469415590 / праймеры	F: 5' – GCTCCAGCGAGCGGTAGTG – 3' R: 5' – GACGTCTCTCGCCTGCTGC – 3'
ss469415590 / TaqMan-зонды	FAM: 5' – ATCGCAGCGGCC – 3' HEX: 5' – ATCGCAGAAGGCC – 3'

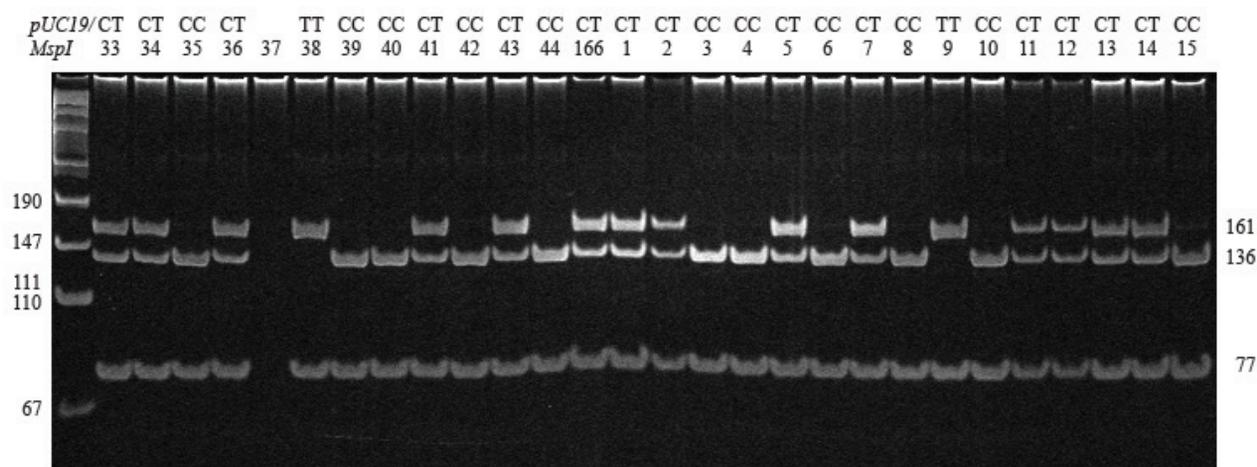


Рис. 1. Электрофореграмма рестрикционных фрагментов полиморфного локуса rs12979860 гена *IL-28B*. pUC19/MspI – маркер; цифры над дорожками – номера проб; верхний ряд – аллельное состояние гена *IL-28B*; слева – размеры фрагментов (п.н.) маркера длин ДНК pUC19/MspI; справа – размеры амплифицированных фрагментов.

Реакционная смесь для определения генотипа по локусу ss469415590 гена *IFNL4* содержала 1× Maxima Probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific), по 0,4 мкМ каждого из праймеров и зондов (табл. 1). Меченый FAM-зонд соответствовал аллелю ΔG, меченый HEX – аллелю TT.

Вирусологическая нагрузка (ВН) в двух группах пациентов с ХВГС 1 генотипа (1-ая группа – генотип CC, 2-ая – генотипы СТ + ТТ rs12979860 гена *IL-28B*) не соответствовала нормальному (гауссовскому) закону распределения. Поэтому содержание вируса было охарактеризовано такими описательными показателями как медиана и процентиля, а сравнение проводилось с применением непараметрического теста – U-критерия Манна-Уитни.

Статистическая обработка выполнена в программах MS Excel 2010, STATISTICA 10 Portable, DoctorStat.

Результаты и обсуждение

Продукт гена *IL-28B* – интерферон-λ3 – является активным участником реакций иммунной системы в ответ на появление в организме возбудителей разнообразных заболеваний. Главными продуцентами этого белка служат плазмоцитоидные и миелоидные дендритные клетки, которые начинают его вырабатывать при развитии гепатита С. Молекулы IFN-λ3 способны запускать интерфероновый сигналинг, что в результате приводит к синтезу продуктов многочисленных

интерферон-стимулируемых генов, оказывающих непосредственное противовирусное действие. Широкий ряд работ подтвердил ассоциацию полиморфного локуса rs12979860 гена *IL-28B* с исходом терапии ХВГС 1 генотипа препаратами пегилированного интерферона и рибавирина [15–21]. Тем не менее, до сих пор в отношении белорусских пациентов подобных исследований не проводилось.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs12979860 гена *IL-28B* между группой пациентов с неуспешным исходом терапии (81 человек) и группой людей с УВО (49 чел.) выявил статистически значимую разницу в распределении частот генотипов CC ($p = 2,3 \cdot 10^{-7}$, $\alpha = 0,05$) и TT ($p = 2,3 \cdot 10^{-3}$, $\alpha = 0,05$). Результаты анализа представлены в табл. 2.

Таким образом, обнаруживается достоверная ассоциация генотипа CC с достижением устойчивого вирусологического ответа по результатам противовирусной терапии. У пациентов-носителей таких аллелей шанс успешно излечиться в 12 раз больше, чем у лиц с генотипами СТ или ТТ (OR = 0,08; 95% CI = 0,03–0,23). Напротив, генотип ТТ явно является неблагоприятным фактором эффективности лечения ($p = 2,3 \cdot 10^{-3}$, $\alpha = 0,05$; OR = 5,02; 95% CI = 1,63–15,49).

Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о прогностических свойствах полиморфного локуса rs12979860 [15–21].

Была обнаружена статистически значимая разница ($p = 1 \cdot 10^{-6}$; OR = 0,28; 95% CI 0,16–0,48) в распределении частот аллелей между двумя вышеуказанными группами (табл. 2). Частота аллеля С достоверно была выше в группе пациентов, достигших УВО в результате лечения.

Проведен сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса rs12979860 гена *IL-28B* между группой лиц, прошедших курс лечения от ХВГС (130 чел.), и группой людей, проживающих в различных регионах Беларуси (596 чел.). Последняя группа не проверялась на носительство ВГС, фенотипически не проявляла признаков болезни и считалась условно здоровой. Анализ выявил статистически значимую разницу как по распределению частот генотипов в двух группах, так и по распределению частот аллелей (табл. 3).

Анализ популяционных частот аллелей позволил сравнить их с опубликованными ранее

результатами определения частот в других популяциях. Так, оказалось, что значение частоты С-аллеля в полиморфном локусе rs12979860 гена *IL-28B* (0,651) у белорусов наиболее близко к таковому финнов, венгров и жителей европейской части России (0,652, 0,651 и 0,641 соответственно) [27].

В 2013 г. было установлено, что rs12979860 гена *IL-28B* располагается в первом интроне недавно обнаруженного гена *IFNL4* и является всего лишь маркером, не несущим функциональной нагрузки. Белок IFNL4 относится к интерферонам типа III и, как и все представители этой группы, способен обеспечивать противовирусную защиту, запуская интерфероновый сигналинг. В первом экзоне этого гена выявлен полиморфный сайт ss469415590 (rs368234815) (TT > ΔG), который, как считается, непосредственно регулирует образование транскрипта и связан с исходом лечения ХВГС 1 генотипа препаратами пегилированного интерферона и рибавирина [22–26].

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса rs12979860 гена *IL-28B* между группой пациентов с неуспешным исходом терапии и группой людей с УВО

Генотип/аллель	Пациенты с неуспешным исходом лечения (частота)	Пациенты с УВО (частота)	Расчетный уровень значимости (p); $\alpha = 0,05$	OR (95% CI)
CC	5 (0,062)	22 (0,449)	$2,3 \cdot 10^{-7}$	0,08 (0,03–0,23)
CT	51 (0,63)	23 (0,469)	0,1	1,92 (0,94–3,95)
TT	25 (0,308)	4 (0,082)	$2,3 \cdot 10^{-3}$	5,02 (1,63–15,49)
C	(0,377)	(0,684)	$1 \cdot 10^{-6}$	–
T	(0,623)	(0,316)		

Таблица 3

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса rs12979860 гена *IL-28B* между группой пациентов, прошедших курс лечения от ХВГС, и популяционной выборкой

Генотип/аллель	Выборка пациентов (частота)	Популяционная выборка (частота)	Расчетный уровень значимости (p); $\alpha = 0,05$	OR (95% CI)
CC	27 (0,208)	257 (0,431)	$1 \cdot 10^{-6}$	0,35 (0,22–0,54)
CT	74 (0,569)	262 (0,44)	$8,6 \cdot 10^{-3}$	1,68 (1,15–2,47)
TT	29 (0,223)	77 (0,129)	$8,8 \cdot 10^{-3}$	1,94 (1,2–3,12)
C	(0,492)	(0,651)	$2 \cdot 10^{-6}$	–
T	(0,508)	(0,349)		

Распределение частот аллелей и генотипов локуса ss469415590 гена *IFNL4* было подобным таковому для ОНП rs12979860 гена *IL-28B* (табл. 4, рис. 2). Более того, полиморфный сайт гена *IFNL4* обладал несколько бóльшими прогностическими свойствами. Так, генотип ТТ/ТТ является предиктором благоприятного исхода терапии препаратами ПегИФН и рибавирина ($p = 5,5 \cdot 10^{-8}$), шанс излечиться у носителей данного аллеля в 16,5 раз больше, чем у обладателей генотипов $\Delta G/TT$ и $\Delta G/\Delta G$ (OR = 0,06; 95% CI 0,02–0,2). В роли неблагоприятного фактора эффективности лечения выступает вариант $\Delta G/\Delta G$ ($p = 3,8 \cdot 10^{-3}$; OR = 4,8; 95% CI 1,55–14,86).

Полученные данные согласуются с исследованиями, в которых показано, что локусы rs12979860 и ss469415590 обладают сопоставимой информативностью в предсказании успеха при этиотропной терапии препаратами

пегилированного интерферона и рибавирина, либо последний локус имеет ненамного бóльшую прогностическую силу [22–26].

Согласно литературным данным, оба вышеуказанных локуса сцеплены между собой. Было установлено, что аллель ΔG (ss469415590) коррелирует с неблагоприятным аллелем T (rs12979860) у людей азиатского и европейского происхождения ($r^2 = 1,00$ и $r^2 = 0,92$, соответственно), умеренная корреляция наблюдается у африканцев ($r^2 = 0,71$). Таким образом, благоприятному варианту CC (rs12979860) соответствует вариант TT/TT (ss469415590) [22].

Среди 123 пациентов у лиц с генотипом CC (rs12979860 *IL-28B*) присутствовал генотип TT/TT (ss469415590 *IFNL4*), с генотипом CT – $\Delta G/TT$, с генотипом TT – $\Delta G/\Delta G$. Лишь у 4 человек наблюдались отличные от указанных сочетания (CC- $\Delta G/TT$ – 1 человек; TT- $\Delta G/TT$ – 1 человек; CT-TT/TT – 2 человека). Полученные

Таблица 4

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса ss469415590 гена *IFNL4* между группой больных с неуспешным исходом терапии и группой людей с УВО

Генотип/аллель	Пациенты с неуспешным исходом лечения (частота)	Пациенты с УВО (частота)	Расчетный уровень значимости (p); $\alpha = 0,05$	OR (95% CI)
TT/TT	4 (0,051)	22 (0,458)	$5,5 \cdot 10^{-8}$	0,06 (0,02–0,2)
$\Delta G/TT$	51 (0,646)	22 (0,458)	0,044	2,15 (1,04–4,47)
$\Delta G/\Delta G$	24 (0,303)	4 (0,084)	$3,8 \cdot 10^{-3}$	4,8 (1,55–14,86)
TT	(0,373)	(0,688)	$1 \cdot 10^{-6}$	–
ΔG	(0,627)	(0,312)		

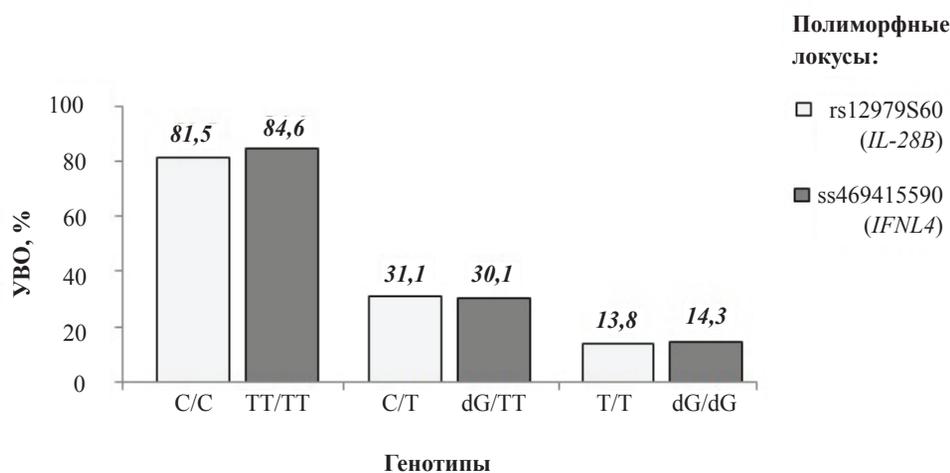


Рис. 2. Встречаемость пациентов с устойчивым вирусологическим ответом среди носителей различных генотипов полиморфных локусов rs12979860 гена *IL-28B* и ss469415590 гена *IFNL4*

данные говорят о высокой степени сцепления двух полиморфных локусов. Из этих четырех пациентов у двух, достигших УВО, был выявлен генотип СТ в локусе rs12979860 гена *IL-28B*. В то же самое время у тех же лиц в локусе ss469415590 гена *IFNL4* детектировался вариант ТТ/ТТ, что говорит о более точной предикции исхода терапии последним полиморфным сайтом в данном случае, в отличие от третьего пациента с успешным исходом терапии, у которого были обнаружены генотипы СС и ΔG/ТТ (*IL-28B* и *IFNL4*, соответственно). Четвертый пациент, у которого отмечался рецидив болезни, обладал вариантами ТТ (*IL-28B*) и ΔG/ТТ (*IFNL4*), таким образом в данном случае оба генотипа указывали на неудачу по итогам лечения.

В популяционной выборке у двух из 300 человек выявлены нехарактерные комбинации: СС-ΔG/ТТ – 1 человек; СТ-ТТ/ТТ – 1 человек.

Полученные результаты, по нашему мнению, подтверждают гипотезу о вкладе аллелей ss469415590 гена *IFNL4* в восприимчивость пациентов к лечению препаратами пегилированного интерферона-α и рибавирина, в то время как rs12979860 гена *IL-28B* является лишь сцепленным с ним маркером [22]. Являясь доминантным, аллель ΔG (*IFNL4*) обуславливает синтез полностью функционального белка, который стимулирует выработку продуктов широкого спектра ISGs у пациентов с вариантами ΔG/ТТ и ΔG/ΔG. Среди белков интерферон-стимулируемых генов вырабатываются также ISG15 и USP18, ингибирующие сигналинг IFN-α, в том числе и экзогенного препарата. Невосприимчивость к вводимому пегилированному интерферону,

вероятно, лежит в основе механизма, который приводит к неуспешному исходу лечения. Напротив, рецессивная гомозигота ТТ/ТТ обуславливает сдвиг открытой рамки считывания и, как следствие, отсутствие синтеза белка. Таким образом, за счет этого у лиц с вышеупомянутым генотипом, скорее всего, активен более ограниченный, но целенаправленно действующий набор ISGs, результатом чего является большая вероятность успешного излечения. Действительно, именно у пациентов с вариантами СС (*IL-28B*) и ТТ/ТТ (*IFNL4*) фиксировалось сниженное содержание продуктов интерферон-стимулируемых генов перед началом терапии относительно пациентов с иными генотипами [22, 28–33].

Проведен сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса ss469415590 гена *IFNL4* между группой лиц (130 чел.), прошедших курс лечения от ХВГС, и контрольной группой условно здоровых людей (300 чел.), проживающих в различных регионах Беларуси. Анализ выявил статистически значимую разницу как между распределением частот генотипов ($p < 0,05$; $\alpha = 0,05$) в двух группах, так и распределением частот аллелей ($p = 2 \cdot 10^{-6}$; OR = 2,05, 95% CI 1,52–2,76) (табл. 5). Среди группы пациентов и популяционной выборки частоты генотипов и аллелей rs12979860 и ss469415590 были распределены схожим образом, что подтверждает сцепление локусов данных генов на хромосоме 19q13.

Наблюдаемое распределение частот встречаемости генотипов для локусов rs12979860 (*IL-28B*) и ss469415590 (*IFNL4*) в исследованных группах подчиняется закону Харди-

Таблица 5

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса ss469415590 гена *IFNL4* между группой людей, прошедших курс лечения от ХВГС, и контрольной группой условно здоровых людей

Генотип/аллель	Выборка пациентов (частота)	Популяционная выборка (частота)	Расчетный уровень значимости (p); $\alpha = 0,05$	OR (95% CI)
ТТ/ТТ	26 (0,205)	134 (0,447)	$2 \cdot 10^{-6}$	0,32 (0,2–0,52)
ΔG/ТТ	73 (0,575)	131 (0,437)	0,011	1,74 (1,15–2,65)
ΔG/ΔG	28 (0,22)	35 (0,117)	$7,2 \cdot 10^{-3}$	2,14 (1,24–3,7)
ТТ	(0,492)	(0,665)	$2 \cdot 10^{-6}$	–
ΔG	(0,508)	(0,335)		

Вайнберга ($\chi^2 < 5,99$), то есть отбор по какому-либо из исследуемых полиморфных локусов отсутствует.

Выполнен анализ вирусологической нагрузки (ВН) в двух группах пациентов с ХВГС 1 генотипа (1-ая группа – генотип СС, 2-ая – генотипы СТ+ТТ rs12979860 гена *IL-28B*). Сравнение уровня ВН у пациентов с различными вариантами в rs12979860 гена *IL-28B* при помощи U-критерия Манна-Уитни позволило выявить разницу на грани достоверности между лицами с различными генотипами (СС vs. СТ+ТТ, $p = 0,053$). Более высокое содержание ВГС перед началом терапии наблюдалось у пациентов с благоприятным для исхода лечения генотипом СС (табл. 6). Подобные результаты были обнаружены в исследова-

ниях Ge et al., 2009 [15] и Stättermayer et al., 2011 [16], где была найдена достоверная ассоциация между уровнем вирусологической нагрузки и однонуклеотидным полиморфизмом rs12979860 гена *IL-28B*. Именно у пациентов с вариантом СС наблюдалось большее содержание вируса.

Более высокая вирусологическая нагрузка наблюдается среди пациентов с благоприятным генотипом, вероятно, благодаря тому, что при варианте СС гена *IL-28B* (соответствующем генотипу ТТ/ТТ гена *IFNL4*) в организме фиксируется пониженная продукция интерферон-стимулируемых генов до начала терапии. Низкое содержание белков ISGs благоприятствует более интенсивному размножению инфекционного агента [15, 16].

Таблица 6

Сравнительная характеристика вирусологической нагрузки в группах пациентов с генотипами СС и СТ+ТТ (rs12979860 гена *IL-28B*), МЕ/мл

Процентили, %	Генотипы	
	СС	СТ + ТТ
5	39 000	107 143
50 (медиана)	1 117 274	743 000
95	20 000 000	7 500 000

Заключение

Таким образом, наше исследование показало на белорусской популяции прогностические свойства ОНП rs12979860 гена *IL-28B* по отношению к исходу терапии пациентов препаратами пегилированного интерферона и рибавирина. Также была установлена значительная степень неравновесного сцепления указанного локуса с локусом ss469415590 гена *IFNL4*. Способность последнего предсказывать исход лечения сопоставима с таковой гена *IL-28B* и даже незначительно ее превосходит. Генотипами, дающими благоприятный прогноз эффективности терапии, выступают СС (*IL-28B*) и ТТ/ТТ (*IFNL4*).

Список использованных источников

1. Hepatitis C. Fact sheet [Electronic resource] / World Health Organization. – Mode of access: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. – Date of access: July, 2016.
2. Иванов, А.В. Молекулярная биология вируса гепатита С / А.В. Иванов, А.О. Кузякин,

С.Н. Кочетков // Успехи биологической химии. – 2005. – Т. 45 – С. 37–86.

3. Hepatitis C virus genetic variability and evolution / N. Echeverría [et al.] // World Journal of Hepatology. – 2015. – Vol. 7 (6). – P. 831–845.

4. Multiple genotypes and subtypes of hepatitis B and C viruses in Belarus: similarities with Russia and western European influences / С.М. Olinger [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2008. – Vol. 14 (6). – P. 575–581.

5. Молекулярно-генетические особенности вируса гепатита С в Республике Беларусь / Е.Л. Гасич [и др.] // Здоровоохранение. – 2010. – Т. 12. – С. 27–34.

6. Maheshwari, A. Acute hepatitis C / A. Maheshwari, S. Ray, P.J. Thuluvath [et al.] // Lancet. – 2008. – Vol. 372. – P. 321–32.

7. National institutes of health consensus development conference: management of hepatitis C: 2002 // Hepatology. – Vol. 36. – P. 1–2.

8. Hajarizadeh, B. Epidemiology and natural history of HCV infection / B. Hajarizadeh, J. Grebely, G.J. Dore // Nature Review Gastro-

- enterology and Hepatology. – 2013. – Vol. 10, № 9. – P. 553–562.
9. Grebely, J. What Is Killing People With Hepatitis C Virus Infection? / J. Grebely, G. Dore // *Seminars in Liver Disease*. – 2011. – Vol. 31, № 4. – P. 331–339.
10. Heim, M.H. Innate immunity and HCV / M.H. Heim // *Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 58. – P. 564–574.
11. Bowen, D.G. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection / D.G. Bowen, C.M. Walker // *Nature*. – 2005. – Vol. 436. – P. 946–952.
12. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial / M.P. Manns [et al.] // *Lancet*. – 2001. – V. 358. – P. 958–965.
13. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection / M.W. Fried [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 347. – P. 975–982.
14. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose / S.J. Hadziyannis [et al.] // *Ann. Intern. Med.* – 2004. – Vol. 140. – P. 346–355.
15. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance / D. Ge [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – P. 399–401.
16. Impact of IL28B Genotype on the Early and Sustained Virologic Response in Treatment-Naïve Patients With Chronic Hepatitis C / A.F. Stättermayer [et al.] // *Clinical gastroenterology and hepatology*. – 2011. – Vol. 9. – P. 344–350.
17. Combined Effects of Different Interleukin-28B Gene Variants on the Outcome of Dual Combination Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Type 1 Infection / J. Fischer [et al.] // *Hepatology*. – 2012. – Vol. 55, No. 6. – P. 1700–1710.
18. IL28B Polymorphisms and Clinical Implications for Hepatitis C Virus Infection in Uzbekistan / D. Khudayberganova [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9(3). – P. 1–5.
19. Complementary Role of Vitamin D Deficiency and the Interleukin-28B rs12979860 C/T Polymorphism in Predicting Antiviral Response in Chronic Hepatitis C / D. Bitetto [et al.] // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 53, No. 4. – P. 1118–1126.
20. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients / N.I. Rallón [et al.] // *AIDS*. – 2010. – Vol. 24(8). – P. 1–14.
21. IL28B SNP rs12979860 Is a Critical Predictor for On-Treatment and Sustained Virologic Response in Patients with Hepatitis C Virus Genotype-1 Infection / C.-Y. Lin [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6 (3). – P. 1–9.
22. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus / L. Prokunina-Olsson [et al.] // *Nat. Genet.* – 2013. – Vol. 45. – P. 164–171.
23. IFNL4 ss469415590 variant is a better predictor than rs12979860 of pegylated interferon-alpha/ribavirin therapy failure in hepatitis C virus/HIV-1 coinfecting patients / S. Franco [et al.] // *AIDS*. – 2014. – Vol. 28 (1). – P. 133–136.
24. The novel *ss469415590* variant predicts virological response to therapy in patients with chronic hepatitis C virus type 1 infection / L. Covolo [et al.] // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2014. – Vol. 39. – P. 322–330.
25. IFNL4 ss469415590 polymorphism contributes to treatment decisions in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1b, but not 2a, infection / R. Wu [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – Vol. 39. – P. 132–140.
26. IFNL4 ss469415590 Variant Shows Similar Performance to rs12979860 as Predictor of Response to Treatment against Hepatitis C Virus Genotype 1 or 4 in Caucasians / L.M. Real [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9(4).
27. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus / D.L. Thomas [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – P. 798–801.
28. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon stimulated genes in patients with chronic hepatitis C / T.J. Urban [et al.] // *Hepatology*. – 2010. – Vol. 52. – P. 1888–1996.
29. Interferon-14 (IFNL4) transcript expression in human liver tissue samples / A. Amanzada [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8 (12). – P. 1–7.
30. Interferon-lambda4 genetic polymorphism is associated with the therapy response for hepatitis C virus recurrence after a living donor liver transplant / H. Konishi [et al.] // *J. Viral. Hepat.* – 2014. – Vol. 21. – P. 397–404.

31. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C / M. Sarasin-Filipowicz [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105(19). – P. 7034–7039.
32. Roles of unphosphorylated ISGF3 in HCV infection and interferon responsiveness / P.S. Sung [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2015. – Vol. 112. – P. 10443–10448.
33. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection / L. Chen [et al.] // Gastroenterology. – 2005. – Vol. 128. – P. 1437–1444.

M.S. Rodzkin¹, A.D. Liaudanski¹, V.S. Pankratov¹, D.Ye. Danilau²

POLYMORPHIC LOCI SS469415590 OF *IFNL4* GENE AND RS12979860 OF *IL-28B* GENE AS GENETIC PREDICTORS OF TREATMENT OUTCOME IN BELARUSIAN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

¹Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University
Dzerzhinski Ave., 83, Minsk, the Republic of Belarus, 220116

About 1% of the Belarusian population is infected with hepatitis C virus. Around the world, up to 700 thousand people die every year due to the lesions caused by the disease. Pegylated interferon and ribavirin are widely used in hepatitis C treatment, while the therapy response is largely determined by the patient's genotype. It was shown that rs12979860 single nucleotide polymorphism (SNP) of *IL-28B* gene appeared to be a reliable predictor of the treatment outcome for Belarusian patients. In its turn, the polymorphic locus ss469415590 of *IFNL4* gene has a predictive power comparable to *IL-28B* gene locus and even slightly exceeds it.

Key words: hepatitis C, genetic predictors, rs12979860, ss469415590.

Дата поступления статьи 11 января 2017 г.

В.Д. Федына, Д.И. Литвин, А.И. Емец, Я.Б. Блюм

РЕАЛИЗАЦИЯ ИНДУЦИРОВАННОЙ СТРЕССОВЫМИ ФАКТОРАМИ АУТОФАГИИ У РАСТЕНИЙ С УЧАСТИЕМ МИКРОТРУБОЧЕК (обзорная статья)

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины
Украина, 04123, г. Киев, ул. Осиповского, 2а
e-mail: blume@nas.gov.ua

Программируемая клеточная гибель (ПКГ) является высококонсервативным процессом элиминации клеток, как в процессе онтогенеза, так и при воздействии неблагоприятных условий окружающей среды. Подобно клеткам животных, клетки растений также демонстрируют различные пути клеточной гибели. Однако, учитывая наличие различий и особенностей программируемой клеточной гибели у представителей этих двух царств, целесообразно не использовать номенклатуру типов ПКГ животных для клеток растений. Основываясь на морфологических характеристиках, у растений выделяют два типа ПКГ: вакуолярная клеточная гибель и некроз. Процесс аутофагии является одним из ключевых звеньев, сопровождающих развитие вакуолярной клеточной гибели у растений. Однако, как дискретный процесс, аутофагия выполняет адаптивную функцию и обеспечивает поддержание гомеостаза как при развитии организма, так и во время выживания. Реализация данного адаптивного процесса в клетке происходит благодаря изменениям функционального состояния микротрубочек путем посттрансляционного ацетилирования α -тубулина, что приводит к стабилизации микротрубочек и изменению их белкового микроокружения, опосредуя биогенез аутофагосом и их внутриклеточный транспорт. Показано, что при развитии аутофагии происходит индуцированное стрессовыми факторами повышение уровней коэкспрессии генов α -тубулина и белка Atg8, что свидетельствует о непосредственном участии МТ в реализации аутофагии в клетке растений.

Ключевые слова: программируемая клеточная гибель, аутофагия, растительная клетка, микротрубочки, тубулин, ацетилирование, белок Atg8, биогенез аутофагосом

Введение

Процессы программируемой клеточной гибели (ПКГ) и аутофагии являются примером высококонсервативных внутриклеточных механизмов, обеспечивающих рост, развитие и функционирование организма в процессе онтогенеза. Наличие схожих для всех эукариот особенностей развития ПКГ и аутофагии указывает на генеалогическую древность и чрезвычайную важность данных процессов для функционирования клеток. Процессы ПКГ в клетках растений опосредуют развитие организма как при физиологических условиях (формирование и прорастание семян, развитие зародыша, образование проводящих тканей ксилемы, процессы старения), так и при патогенной инвазии и влиянии абиотических стрессовых факторов [1, 2]. Аутофагия, как механизм деградации и переработки органелл и макромолекул, также выполняет фундамен-

тальную роль в реализации вышеупомянутых клеточных процессов, в частности, в развитии и выживании организма, к тому же является интегрированной в реализацию ПКГ [1–3]. Микротрубочковый (МТ) цитоскелет является важным клеточным компонентом, опосредующим многочисленные процессы, такие, как рост и деление клетки, определение ее формы, дифференциацию и внутриклеточный транспорт; благодаря своей динамической природе, МТ также являются высокочувствительным сенсором внешних стимулов, способствуя реализации клеточного сигналинга [4–6]. Одним из функциональных свойств МТ является их участие в реализации ПКГ и аутофагии. В частности, для клеток животных была показана роль МТ в индукции аутофагии, созревании аутофагосом и их внутриклеточном транспорте [7, 8]. Однако механизм участия МТ в реализации адаптивных процессов в клетках

растений является еще недостаточно изученным. В данной работе приводится обзор типов ПКГ у растений, а также экспериментальные данные, свидетельствующие о вовлечении МТ в реализацию адаптивных клеточных процессов, в частности, аутофагии.

Программируемая клеточная гибель у растений

Интерес к исследованию программируемой клеточной гибели у растений значительно усилился в последнее время ввиду важности клеточной гибели для развития и выживания растительных организмов. Особенности развития и реализации ПКГ у животных были достаточно детально изучены ранее, что позволило выделить три основных типа клеточной гибели: апоптоз (тип I), аутофагия (тип II) и некроз (тип III) [9].

Апоптоз является наиболее изученным типом ПКГ по сравнению с аутофагическим путем гибели и некрозом. Процесс апоптоза в клетке животных обязательно сопровождается изменением формы клетки (округлением), ретракцией цитоплазмы в связи с изменением внутриклеточного обмена $K^+/Na^+/Cl^-$ [10], зависимой от каспазы-3 конденсацией хроматина и нуклеосомной фрагментацией ДНК [6]. Отличительной чертой апоптоза является вакуоляризация плазматической мембраны и последующая фрагментация клетки с формированием апоптических телец, которые в дальнейшем поглощаются фагоцитами и подвергаются деградации лизосомными ферментами. Поскольку многие процессы, характерные для апоптоза (активация каспаз и фрагментация нуклеосомной ДНК), происходят также в ходе развития и других типов клеточной гибели, термин «апоптоз» следует применять исключительно к процессам со всеми вышеупомянутыми морфологическими особенностями.

Ключевым фактором при выборе типа клеточной гибели являются время влияния и степень воздействия стрессового фактора [9]. В отличие от апоптоза, некроз развивается вследствие влияния жестких стрессовых факторов, парализующих способность реализации апоптического пути гибели. Несмотря на то, что некроз больше не считается неконтролируемым клеточным процессом, механизм его реализации является плохо изученным как на биохимическом,

так и на генетическом уровнях. В клетках животных морфологически некроз выявляется при отсутствии признаков, характерных для апоптоза; первичном увеличении объема клетки, вызванным потерей способности к осморегуляции [11]; свеллинге большинства органелл; ранним разрушением плазматической мембраны и деградацией внутриклеточного содержимого [12, 13]. Также характерными особенностями некроза у животных являются повышение цитозольной концентрации ионов Ca^{2+} , деградация жиров и активация кальпаиновых протеаз. В реализацию некроза в клетках животных также вовлечены митохондрии и лизосомы. В частности, митохондрии продуцируют активные формы кислорода (ROS) и азота (RNS), в клетке происходит снижение уровня АТФ и пермеабиллизация мембран митохондрий. Мембраны лизосом, в свою очередь, также подвергаются разрывам, что приводит к выходу активных катепсиновых протеаз в цитозоль [14, 15].

ПКГ у растений является чрезвычайно важным процессом, обеспечивая нормальное развитие организма на протяжении онтогенеза (формирование и прорастание семян, развитие зародыша, прорастание и развитие пыльцы, образование проводящих тканей ксилемы, тканеспецифическое старение и т.п. [2]), так же, как и при неблагоприятных условиях окружающей среды, в частности, влиянии абиотических факторов и патогенной инвазии [16]. Подобно клеткам животных, растения также демонстрируют различные пути клеточной гибели. Однако, учитывая наличие различий и особенностей программируемой клеточной гибели в этих двух царствах, целесообразно не использовать номенклатуру типов ПКГ животных для обозначения сходных процессов в клетках растений [13]. Несмотря на значительное количество работ, предполагающих и описывающих наличие апоптоза и апоптоз-подобных процессов у растений, существует несколько важных характеристик, подтверждающих недопустимость использования термина «апоптоз» по отношению к схожему процессу в клетках растений. Прежде всего, конденсация хроматина и фрагментация нуклеосомной ДНК не являются отличительными признаками апоптоза, поскольку могут происходить как в процессе некроза, так и при

аутофагии [17, 18]; ретракция протопласта, наблюдаемая у растений, не является схожей с таковой у животных, поскольку сопровождается нарушением целостности плазматической мембраны и не приводит к образованию апоптических телец [19]. А каспазо-подобная активность, выявляемая у растений, не всегда приводит к апоптической морфологии клеток [20, 21]. Исходя из вышесказанного, использование термина «апоптоз» для растений является некорректным, при этом у растений может быть выделено по крайней мере два типа программируемой клеточной гибели: вакуолярная клеточная гибель и некроз [13].

В отличие от лизосом животных, вакуоли растений могут занимать большую часть объема клетки. И подобно лизосомам, литические вакуоли растений выполняют функции деградации и рециркуляции клеточных компонентов, как при нормальном развитии, так и в условиях метаболического стресса. Одной из основных характеристик литических вакуолей является их участие в реализации вакуолярной клеточной гибели. Данный тип растительной клеточной гибели подразумевает постепенное уменьшение объема цитоплазмы и соответствующее увеличение объема, занимаемого литическими вакуолями вследствие постепенного поглощения ими внутриклеточного содержимого для его дальнейшей деградации. Данный процесс является схожим с механизмом микро- и макроаутофагии [2, 22–24]. На финальном этапе вакуолярной клеточной гибели происходит разрыв тонопласта и массовое высвобождение вакуолярных гидролаз, что приводит к разрушению протопласта или даже всей клетки вместе с клеточной стенкой. Характерными морфологическими признаками вакуолярной клеточной гибели являются: накопление аутофагосом и маленьких литических вакуолей, формирование актиновых тяжей, разрушение ядерной оболочки и, в некоторых случаях, сегментация ядра. При этом органеллы клетки, как и плазматическая мембрана, остаются интактными до момента разрыва тонопласта. Вакуолярная клеточная гибель обеспечивает нормальное развитие растительного организма в процессе онтогенеза, принимая участие в развитии зародыша, морфогенезе тканей и органов, реализации старения, формировании клеток суспензора, пыльцы, проток, млечников и др. [2].

Некротическая гибель (некроз), второй тип программируемой клеточной гибели у растений, имеет несколько отличительных цитологических признаков, к числу которых относят свеллинг митохондрий, отсутствие растущих литических вакуолей, а также ранний разрыв плазматической мембраны, приводящий к ретракции протопласта. Для животных клеток было показано, что первоначальное увеличение объема клетки вследствие нарушения работы ионных насосов сопровождается последующей ретракцией клетки [12]. В отличие от клеток животных, растительная клетка окружена жесткой клеточной стенкой, которая противодействует свеллингу протопласта на ранних стадиях некроза и усложняет детекцию данного процесса [25]. Однако нарушение целостности плазматической мембраны на первичных этапах некроза позволяет легко определить ретракцию протопласта.

Аутофагия как адаптивная клеточная реакция

Аутофагия является высококонсервативным внутриклеточным процессом деградации и рециркуляции макромолекул и органелл. Данная клеточная реакция происходит как при физиологических условиях, обеспечивая прохождение этапов онтогенеза, так и под влиянием стрессовых факторов, выполняя адаптивную функцию.

Для растений описано два основных типа аутофагии: микро- и макроаутофагия [26, 27]. При микроаутофагии происходит инвагинация вакуолярной мембраны с одновременным захватом внутриклеточных компонентов, ее дальнейшее отщепление и деградация внутри вакуоли. Данный процесс обеспечивает накопление запасующихся белков в вакуолях развивающихся семян пшеницы, деградацию крахмальных зерен в прорастающих семенах, старение лепестков и др. [28]. Развитие макроаутофагии (термин, под которым как правило подразумевают аутофагию) предусматривает образование аутофагосом, двумембранных органелл, которые доставляют цитоплазматические компоненты к литическим вакуолям для их дальнейшей деградации гидролитическими ферментами [29]. Гены, принимающие участие в регуляции данного процесса, делятся на несколько

функциональных групп и являются схожими с таковыми в других царствах эукариот, в связи с высокой консервативностью процесса аутофагии. К первой группе относятся гены, отвечающие за формирование преаутофагосомной мембраны (ПАМ) и биогенез аутофагосом, а именно, гены Atg1-киназного комплекса (индукция и регуляция аутофагии с помощью TOR-киназы), комплекс фосфатидилинозитол 3-фосфат киназ III класса (привлечение белков Atg9, связывающих фосфатидилинозитол 3-фосфат, к преаутофагосомной мембране) и комплекс трансмембранных белков Atg9 (участие в формировании аутофагосомной мембраны). Ко второй группе относятся гены, продукты которых принимают участие в процессах созревания аутофагосом: Atg8- и Atg12-конъюгационные системы (см. [26, 30–32]).

Процесс аутофагии является одним из ключевых звеньев, сопровождающих развитие вакуолярной клеточной гибели у растений. Показано, что нокаут генов *Atg* у *Arabidopsis thaliana* усиливает старение листьев [33, 34], также было продемонстрировано, что *Atg5* является необходимым для реализации вакуолярной клеточной гибели проводящих элементов ксилемы [35]. На данный момент роль аутофагии в процессе вакуолярной клеточной гибели изучена плохо. Однако, как дискретный процесс, аутофагия выполняет адаптивную функцию и обеспечивает поддержание гомеостаза при физиологических условиях и выживание при влиянии стрессовых факторов. Одним из ключевых факторов, индуцирующих развитие аутофагии, является недостаток питательных веществ, в частности, наиболее широко распространены являются углеводное и азотное голодание [36–41]. Аутофагия также является адаптивным механизмом в ответ на солевой и осмотический стрессы, принимая участие в нейтрализации окисленных белков и регуляции уровня активных форм кислорода [42–44].

В эукариотических клетках аутофагия, как правило, происходит как высокоселективный процесс [29]. Ранее для клеток растений было показано наличие гомологов животных рецепторов специфического содержимого аутофагосом p62 и NBR1 [29, 45, 46]. Однако на данный момент доказательств селективности аутофагии у растений накоплено

недостаточно. Считается, что белки Atg8 непосредственно отвечают за специфическое распознавание клеточных компонентов для последующей деградации благодаря наличию Atg8-взаимодействующего мотива, выполняющего функцию адаптера для маркировки цитоплазматических компонентов [47]. Недавно было показано, что аутофагия является регулятором качества присутствующих в клетке пероксисом, в частности, селективная деградация окисленных пероксисом происходит путем аутофагии, предотвращая накопление разрушенных органелл в растительной клетке. Однако следует отметить, что специфический адаптер, связывающий пероксисомы и фагофор, не идентифицирован [48, 49].

Микротрубочковый цитоскелет в клетке растений

Микротрубочки (МТ) являются одним из функциональных структурных элементов эукариотических клеток. Принимая участие в реализации многих клеточных процессов, таких как регуляция клеточной формы и деление клетки, позиционирование органелл, внутриклеточный транспорт, определение клеточной формы и полярности, адаптивные клеточные реакции, микротрубочки обеспечивают поддержание гомеостаза и нормальное функционирование клеток растений [5, 6, 50].

МТ являются динамическими нестабильными структурами, что обеспечивает существование их лабильных и стабильных популяций и предопределяет выполнение ими различной функциональной нагрузки. Результаты исследований динамики микротрубочек *in vitro* позволили выделить среди растительных белков, ассоциированных с МТ (БАМов): МТ-стабилизирующие белки – семейства MAP65 и CLASP; дестабилизаторы микротрубочек – кинезин-13, катанин, MAP18 и MDO25; белки, которые ситуативно влияют на динамику МТ – EB1, MAP215, MOR1, MAP200 и SPR2 [51]. Одним из ключевых факторов, определяющих функциональное состояние микротрубочек, являются посттрансляционные модификации тубулина. Такие модификации могут непосредственно воздействовать на динамическое состояние микротрубочек, а также косвенно влиять на

их белковое микроокружение путем изменения аффинности к регуляторным белкам [52]. Наиболее изученными посттрансляционными модификациями тубулина, характерными для большинства эукариот, являются ацетилирование, детирозилирование, фосфорилирование, полиглутаминирование, а также полиглицирование [54]. Большинство из них происходит на С-конце α -тубулина, экспонируемом на внешней поверхности микротрубочки, таким образом, регулируя аффинность микротрубочек к моторным белкам и БАМам [54]. Следует отдельно выделить ацетилирование α -тубулина как единственную посттрансляционную модификацию, которая происходит непосредственно в люмене микротрубочки. Данная модификация катализируется консервативной ацетилтрансферазой α -тубулина, однако сам механизм реакции является еще недостаточно изученным [55]. Установлено, что ацетилирование α -тубулина является ключевой посттрансляционной модификацией, опосредующей формирование адаптивных клеточных реакций, в частности, реализацию процессов стресс-индуцированной аутофагии в клетке животных [56] и растений [57].

Функциональная роль микротрубочек в реализации аутофагии

В связи с доказанным участием ацетилирования α -тубулина в реализации процессов аутофагии, детализация механизмов участия микротрубочек в реализации клеточной гибели является одним из наиболее изучаемых на сегодня вопросов. В частности, это касается механизмов участия МТ в опосредовании биогенеза аутофагосом и их внутриклеточного транспорта, что было показано для клеток животных [7, 8]. Использование антимикротрубочковых агентов нокодазола (для деполимеризации МТ) и винбластина (для стабилизации МТ) при исследовании аутофагии экспериментально подтверждает вышеупомянутые функции микротрубочек, поскольку приводит к снижению количества и скорости формирования аутофагосом, а также нарушению их транспорта в клетке [58]. Следует отметить, что МТ могут контактировать с аутофагосомами непосредственно, взаимодействуя с LC3

(гомолог Atg8 млекопитающих), структурной молекулой аутофагосомной мембраны, а также через моторные белки (кинезин-1, кинезин-2 KIF2A и кинезин-3 KIF1B) [8]. В случае растительной аутофагии, основываясь на результатах поиска растительных гомологов LC3, возможно предположить наличие сходных механизмов взаимодействия микротрубочек с аутофагосомами. В частности, для *A. thaliana* было показано наличие Atg8 – гомолога легкой цепи 3 MAP1A и B (LC3) и его фундаментальная роль в развитии аутофагии при различных экспериментальных условиях [59, 60]. Одним из отличительных признаков развития аутофагии является процессинг Atg8, который подразумевает отщепление С-терминального участка молекулы цистеиновой протеазой Atg4 и последующую конъюгацию с фосфатидилэтаноламином, позволяя встраивание модифицированной молекулы (Atg8-PE) в мембрану формирующейся аутофагосомы [61]. Следует отметить, что две конъюгационные системы, обеспечивающие процесс реализации растительной аутофагии (одна включает процесс модификации Atg8, а вторая – образование комплекса Atg12-Atg5-Atg16), являются схожими к таковым в клетках животных [62].

Как упоминалось выше, важная роль в реализации процессов аутофагии отводится посттрансляционным модификациям α -тубулина, а именно, ацетилированию. Хотя, как правило, микротрубочки функционируют как высокоструктурные, ацетилирование α -тубулина по остатку Лиз-40 связывают со стабилизацией микротрубочкового цитоскелета. С помощью структурного моделирования было показано, что стабильность гиперацетилированных микротрубочек, наблюдаемая *in vivo*, происходит благодаря стабилизации латеральных взаимодействий протофиламентов микротрубочек [63].

Ацетилирование МТ является необходимым для слияния новообразованных аутофагосом с лизосомами и формирования аутолизосом [64], кроме того, привлечение к ацетилированным МТ кинезина-1 активирует JNK1-киназу и приводит к фосфорилированию Bcl-2, высвобождению Beclin1 и последующему формированию аутофагосом [56]. На сегодняшний

день данных, подтверждающих взаимосвязь ацетилирования тубулина и растительной аутофагии, крайне мало. Ранее нами было показано, что в клетках культуры табака ВУ-2 *N. tabacum* развитие аутофагии, индуцированной влиянием абиотических стрессовых факторов, строго коррелирует с повышением уровня ацетилирования α -тубулина. Более того, дальнейшее снижение уровня аутофагии совпадало во времени с деацетилированием α -тубулина и сопровождалось последующим развитием нуклеосомной фрагментации ДНК [65], что свидетельствует о функциональной роли ацетилирования МТ в реализации стресс-индуцированных адаптивных процессов в клетке растений.

Для дальнейшего исследования взаимосвязи между МТ и развитием аутофагии, нами был проведен транскрипционный анализ профиля экспрессии генов α -тубулина (6 изоформ) и *atg8* (9 изоформ) при воздействии стрессовых факторов на проростки *A. thaliana*, а именно, метаболического стресса (проращивания и культивирования в среде, не содержащей сахарозы), солевого стресса (проращивания и культивирования в присутствии 150 мМ NaCl) и облучения ультрафиолетом-В (УФ-В) в дозе 41 кДж/м² осуществляли на шестой день культивирования, используя полистироловый фильтр для исключения длин волн спектра УФ-С и коротковолнового диапазона УФ-В [66], проростки анализировали через

24 ч после облучения). В качестве контроля использовали растения, выращиваемые в стандартных условиях. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о стресс-индуцированном характере экспрессии исследуемых генов (рис. 1).

В частности, облучение ультрафиолетом-В вызывало повышение уровней экспрессии генов *tua4*, а также *atg8f* и *atg8g*. При этом следует отметить, что УФ-В усиливал экспрессию практически всех исследуемых генов. В условиях индукции аутофагии соевым стрессом наблюдали подобную картину, а именно, индукцию уровней экспрессии генов *tua4*, а также *atg8g* и *atg8h*, однако при этом происходило снижение уровня экспрессии гена *tua3*. В условиях метаболического стресса происходило повышение уровней экспрессии, в той или иной мере, всех генов α -тубулина и *atg8*. Тем не менее, уровни экспрессии генов *tua5*, *tua6* и *atg8f*, *atg8h*, *atg8i* повышались наиболее выразительно. Учитывая, что данные стрессовые факторы вызывают несколько отличающиеся изменения в уровнях экспрессии исследуемых генов, логично предположить, что клетки растений реализовывают развитие стресс-индуцированной аутофагии на транскрипционном уровне. Однако общая тенденция к повышению уровней коэкспрессии генов α -тубулина и *atg8* подтверждает прямую взаимосвязь между микротрубочками и развитием аутофагии от характера стрессового фактора, воздействию которого подвергались растения.

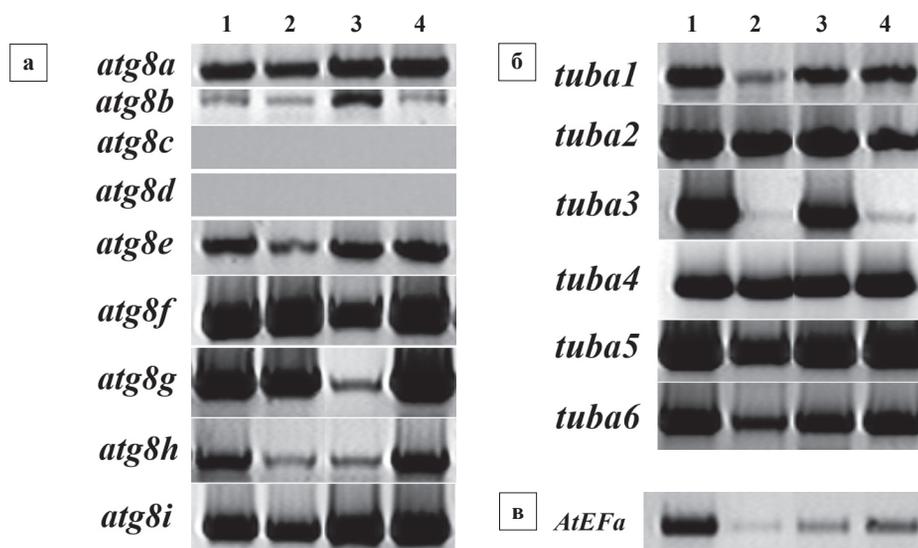


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР-реакции кДНК с праймерами к генам: а – белка Atg8; б – α -тубулина; в – *AtEFa*. Дорожки 1 – контроль, 2 – облучение УФ-В, 3 – метаболический стресс, 4 – солевой стресс

Заключение

Таким образом, на сегодняшний день понимание особенностей процессов ПКГ у растений в большей мере базируется на результатах морфологических исследований данных адаптивных процессов в погибающих клетках. С другой стороны, часто приходится делать предположения по аналогии с соответствующим, более детально изученным, процессом у животных. И хотя процессы ПКГ в клетках растений и животных имеют ряд схожих характеристик, в частности, нуклеосомная фрагментация ДНК, каспазо-подобная активность и высвобождение цитохрома *c* из митохондрий, использование классификации типов ПКГ животных для таковых у растений является необоснованным. Учитывая морфологические особенности развития ПКГ в клетках растений, выделяют два типа данного процесса: вакуолярную клеточную гибель и некроз. Процесс аутофагии принимает участие в реализации вакуолярной клеточной гибели, однако, как дискретный процесс также несет значительную функциональную нагрузку, а именно, служит адаптивной клеточной реакцией в ответ на воздействие стрессовых факторов.

Одна из важнейших ролей в реализации ПКГ и аутофагии отводится микротрубочкам, что характерно как для клеток животных, так и растений, однако механизмы реализации данных защитных механизмов у растений изучены недостаточно. Проведенный транскриптомный анализ профиля экспрессии генов α -тубулина и белка Atg8 подтверждает участие МТ в реализации адаптивных клеточных механизмов и свидетельствует о некоторой диверсификации путей реализации аутофагии в клетке в зависимости от характера стрессового фактора, воздействующего на растение. Для дальнейшего изучения механизмов адаптивных процессов важно определить белковое микроокружение МТ при физиологических и стрессовых условиях, и идентифицировать моторные белки и БАМы, опосредующие реализацию ПКГ и аутофагии в клетке растений.

Список использованных источников

1. McCabe, P.F. Apoptotic-like programmed cell death in plants / P.F. McCabe, T.J. Reape // *New Phytol.* – 2008. – Vol. 180. – P. 13–26.

2. Van Doorn, W.G. Many ways to exit? Cell death categories in plants / W.G. van Doorn, E.J. Woltering // *Trends Plant Sci.* – 2005. – Vol. 10 (3). – P. 117–122.

3. Van Doorn, W.G. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals / W.G. van Doorn // *J. Exp. Bot.* – 2011. – Vol. 62 (14). – P. 4749–4761.

4. Nick, P. Microtubules, signalling and abiotic stress / P. Nick // *Plant J.* – 2013. – Vol. 75 (2). – P. 309–323.

5. Hamada, T. Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells / T. Hamada // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 312. – P. 1–52.

6. Wasteneys, G.O. Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? / G.O. Wasteneys // *J. Cell Sci.* – 2002. – Vol. 115, Pt 7. – P. 1345–1354.

7. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy / I. Monastyrska [et al.] // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 2009. – Vol. 84 (3). – P. 431–448.

8. Autophagy and microtubules – new story, old players / R. Mackeh [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2011. – Vol. 126. – P. 1071–1080.

9. Lockshin, R.A. Apoptosis, autophagy, and more / R.A. Lockshin, Z. Zakeri // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 36. – P. 2405–2419.

10. Bortner, C.D. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes. Role in apoptosis / C.D. Bortner, J.A. Cidlowski // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2007. – Vol. 462 (2). – P. 176–188.

11. Lennon, S.V. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli / S.V. Lennon, S.J. Martin, T.G. Cotter // *Cell Prolif.* – 1991. – Vol. 24 (2). – P. 203–214.

12. Majno, G. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death / G. Majno, I. Joris // *Am. J. Pathol.* – 1995. – Vol. 146 (1). – P. 3–15.

13. Morphological classification of plant cell deaths / W.G. van Doorn [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2011. – Vol. 18 (8). – P. 1241–1246.

14. Christofferson, D.E. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death / D.E. Christofferson, J. Yuan // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 22 (2). – P. 263–268.

15. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on cell death / G. Kroemer // *Cell Death Differ.* – 2005. – Vol. 12. – P. 1463–1467.

16. Reape T.J. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes / T.J. Reape, E.M. Molony, P.F. McCabe // *J. Exp. Bot.* – 2008. – Vol. 59 (3). – P. 435–444.
17. Fink, S.L. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells / S.L. Fink, B.T. Cookson // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73 (4). – P. 1907–1916.
18. Lee, C. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development / C. Lee, E.H. Baehrecke // *Development.* – 2001. – Vol. 128 (8). – P. 1443–1455.
19. Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies / R. Nunez [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2010. – Vol. 17. – P. 1665–1671.
20. Plant Vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death / N. Hatsugai [et al.] // *Science.* – 2016. – Vol. 305 (5685). – P. 855–858.
21. A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens / N. Hatsugai [et al.] // *Genes Dev.* – 2009. – Vol. 23 (21). – P. 2496–2506.
22. Bozhkov, P.V. Programmed cell death in plant embryogenesis / P.V. Bozhkov, L.H. Filonova, M.F. Suarez // *Curr. Top. Dev. Biol.* – 2005. – Vol. 67 (4). – P. 135–179.
23. Beers, E.P. Programmed cell death during plant growth and development / E.P. Beers // *Cell Death Differ.* – 1997. – P. 649–661.
24. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce / L.H. Filonova [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2000. – Vol. 113 (24). – P. 4399–4411.
25. Jones, A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? / A. Jones // *Trends Plant Sci.* – 2000. – Vol. 5 (5). – P. 225–230.
26. Bassham, D.C. Plant autophagy-more than a starvation response / D.C. Bassham // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 10 (6). – P. 587–593.
27. Autophagy in development and stress responses of plants / D.C. Bassham [et al.] // *Autophagy.* – 2006. – Vol. 2 (1). – P. 2–11.
28. Van Doorn, W.G. Macroautophagy and microautophagy in relation to vacuole formation in mesophyll cells of *Dendrobium* tepals / W.G. van Doorn, K. Kirasak, S. Ketsa // *J. Plant Physiol.* – 2015. – Vol. 177. – P. 67–73.
29. Liu Y, Bassham DC. Autophagy: Pathways for self-eating in plant cells / Y. Liu, D.C. Bassham // *Plant Biol.* – 2012. – Vol. 63. – P. 215–237.
30. Genes for plant autophagy: Functions and interactions / S.H. Kim [et al.] // *Mol Cells.* – 2012. – Vol. 34 (5). – P. 413–423.
31. Yoshimoto, K. Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants / K. Yoshimoto // *Plant Cell Physiol.* – 2012. – Vol. 53 (8). – P. 1355–1365.
32. Yang, X. New Insight into the mechanism and function of autophagy in plant cells / X. Yang, DC. Bassham // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 320. – P. 1–40.
33. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana* / J.H. Doelling [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 33 105–33 114.
34. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene / H. Hanaoka [et al.] // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 129 (3). – P. 1181–1193.
35. The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in *Arabidopsis* / S.H. Kwon [et al.] – *Plant J.* – 2010. – Vol. 2. – P. 151–164.
36. Moriyasu, Y. Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation / Y. Moriyasu, Y. Ohsumi // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 111 (4). – P. 1233–1241.
37. Voitsekhovskaja, O.V. Plant peroxisomes are degraded by starvation-induced and constitutive autophagy in tobacco BY-2 suspension-cultured cells / O.V. Voitsekhovskaja, A. Schiermeyer, S. Reumann // *Front. Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5. – P. 629. – doi:10.3389/fpls.2014.00629.
38. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana* / J.H. Doelling [et al.] // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277 (36). – P. 33 105–33 114.
39. 3-Methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions / C. Takatsuka [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2004. – Vol. 45 (3). – P. 265–274.
40. Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under

both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis* / A. Guiboileau [et al.] // *New Phytol.* – 2012. – Vol. 194 (3). – P. 732–740.

41. Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in *Arabidopsis* leaves depending on nitrate availability / A. Guiboileau [et al.] // *New Phytol.* – 2013. – Vol. 199 (3). – P. 683–694.

42. Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis* / Y. Xiong [et al.] // *Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 143 (1). – P. 291–299.

43. Role of plant autophagy in stress response / S. Han [et al.] // *Protein Cell.* – 2011. – Vol. 2 (10). – P. 784–791.

44. Oxidative stress-induced autophagy in plants: The role of mitochondria / F. Minibayeva [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 2012. – Vol. 59. – P. 11–19.

45. Identification and functional analysis of Joka2, a tobacco member of the family of selective autophagy cargo receptors / K. Zientara-Rytter [et al.] // *Autophagy.* – 2011. – Vol. 7 (10). – P. 1145–1158.

46. Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1 / S. Svenning [et al.] // *Autophagy.* – 2011. – Vol. 7 (9). – P. 993–1010.

47. Michaeli, S. Degradation of organelles or specific organelle components via selective autophagy in plant cells / S. Michaeli, G. Galili // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 7624–7638.

48. Plant autophagy is responsible for peroxisomal transition and plays an important role in the maintenance of peroxisomal quality / M. Shibata [et al.] // *Autophagy.* – 2014. – Vol. 10 (5). – P. 936–937.

49. Lee, H.N. Degradation of plant peroxisomes by autophagy / H.N. Lee, J. Kim, T. Chung // *Front Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5. – P. 139. – doi:10.3389/fpls.2014.00139.

50. De Keijzer, J. Microtubule networks for plant cell division / J. de Keijzer, B.M. Mulder, M.E. Janson // *Syst. Synth. Biol.* – 2014. – Vol. 8 (3). – P. 187–194.

51. Hamada T. Lessons from in vitro reconstitution analyses of plant microtubule-associated proteins / T. Hamada // *Front. Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5. – P. 409. – doi:10.3389/fpls.2014.00409.

52. Hammond, J. Tubulin modifications and their cellular functions / J. Hammond, D. Cai, K.J. Verhey // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 20 (1). – P. 71–76.

53. Janke, C. Post-translational modifications: Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions / C. Janke, J.C. Bulinski // *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 12 (12). – P. 773–786.

54. Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells / A. Smertenko [et al.] // *Planta.* – 1997. – Vol. 201 (3). – P. 349–358.

55. Structure of the α -tubulin acetyltransferase, α TAT1, and implications for tubulin-specific acetylation / D.R. Friedmann [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109(48). – P. 19 655–19 660.

56. Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation / C. Geeraert [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285 (31). – P. 24 184–24 194.

57. Acetylation of α -tubulin on Lys 40 Is a widespread post-translational modification in Angiosperms / U. Nakagawa [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2013. – Vol. 77 (7). – P. 1602–1605.

58. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes / R. Ko [et al.] // *Traffic.* – 2006. – Vol. 4. – P. 129–145.

59. The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis* plants / S. Slavikova [et al.] // *J Exp Bot.* – 2005. – Vol. 56 (421). – P. 2839–2849.

60. An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of *Arabidopsis* seedlings to hormonal controls and abiotic stresses / S. Slavikova [et al.] // *J Exp Bot.* – 2008. – Vol. 59. – P. 4029–4043.

61. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing / Y. Kabeya [et al.] // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19 (21). – P. 5720–5728.

62. Chung, T. ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A and ATG12B loci. / T. Chung, A.R. Phillips, R.D. Vierstra // *Plant J.* – 2010. – Vol. 62 (3). – P. 483–493.

63. Posttranslational acetylation of α -tubulin constrains protofilament number in native microtubules / J.G. Cueva [et al.] // *Curr Biol.* – 2012. – Vol. 22 (12). – P. 1066–1074.

64. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes / R. Xie [et al.] // *BMC Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11 (1). – P. 89. – doi:10.1186/1471-2121-11-89.

65. Ацетилювання α -тубуліну впливає на зміни білкового мікрооточення мікро-

трубочок при розвитку аутофагії в клітинах тютюну / Д.І. Литвин [та інш.] // *Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр.* – К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. – 2015. – Т. 17. – С. 65–69.

66. Lytvyn, D.I. UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line / D.I. Lytvyn, A.I. Yemets, Y.B. Blume // *Environ. Exp. Bot.* – 2010. – Vol. 68. – P. 51–57.

V.D. Fedyna, D.I. Lytvyn, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

REALISATION OF STRESS-INDUCED AUTOPHAGY IN PLANTS WITH PARTICIPATION OF MICROTUBULES (review)

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine
Ukraine, Kyiv, 04123, 2a Osypovskogo str.

Processes associated with programmed cell death (PCD) and autophagy are highly conservative intracellular mechanisms that provide a wide range of functions covering a variety of cellular events from development to survival. Although, the morphology of plant PCD is, in some cases, well-characterized and molecular mechanisms, controlling plant PCD are beginning to emerge, there is still confusion about the classification of PCD in plants. According to morphological features of plant PCD, at least two classes of PCD can be distinguished: vacuolar cell death and necrosis. The process of autophagy is one of the key elements that accompany the development of vacuolar cell death in plants. However, autophagy, as a discrete process, plays an important role in maintaining of cell homeostasis and performs an adaptive role during plant development and survival. Autophagic protein and organelle degradation/recycling is a fundamental mechanism of cellular maintenance and survival. Important role of microtubules (MTs) in the regulation of autophagy development is widely described for yeasts and animal cells. In these cells MTs are involved as a part of the machinery in maturation and traffic of autophagosomes via their dynamic structural changes and tubulin posttranslational modifications, in particular, acetylation. To investigate the relationships between MTs and stress-induced autophagy, an expression profiling of α -tubulin and *atg8* isotypes was performed. It was observed that the overexpression of certain isotypes of *atg8* and α -tubulin genes was dependent on the defined stress types under autophagy development, which also underlines the functional role of microtubules in adaptive cellular processes in plants.

Key words: microtubules, programmed cell death, autophagy, acetylation, plant cell

Дата поступления статьи 27 ноября 2016 г.

Е.В. Воронкова, В.И. Лукша, О.Н. Гукасян, Ю.В. Полюхович, В.М. Жарич, А.П. Ермишин

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИТОТИЧЕСКОЙ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ *IN VITRO* ДЛЯ СОЗДАНИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ РОДИТЕЛЬСКИХ ЛИНИЙ КАРТОФЕЛЯ

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

В результате колхичинирования *in vitro* диплоидных клонов картофеля, отобранных по наличию комплекса генов устойчивости к болезням и вредителям, был получен ряд митотически удвоенных клонов. Несмотря на цитогенетическую нестабильность и пониженный уровень фертильности, удалось получить половое потомство некоторых из них в скрещиваниях с тетраплоидными сортами. Характер наследования ДНК-маркеров генов устойчивости к нематоду у гибридов удвоенного клона IGC 08/28.39-C14/6 с нуллиплексным по этим генам сортом Katahdin указывает на дуплексное состояние анализируемых генов. Это дает основание рассматривать данный клон в качестве мультиплексной родительской линии, перспективной для селекции сортов картофеля с комплексной устойчивостью к болезням и вредителям.

Ключевые слова: картофель, дигаплоиды, митотическая полиплоидизация, мультиплексные линии, гены устойчивости.

Введение

На борьбу с болезнями и вредителями картофеля агротехническими методами в мире ежегодно тратятся миллиарды долларов США. Однако эти методы не всегда оказываются достаточно эффективными, и, как правило, связаны с существенной нагрузкой на окружающую среду. Считается, что наиболее экономически эффективным методом борьбы с болезнями и вредителями картофеля является выращивание сортов, обладающих генетически детерминированной устойчивостью к комплексу патогенов [1, 2 и др.]. Однако сортов картофеля с комплексной устойчивостью к болезням и вредителям сравнительно немного, так как селекция этой культуры сопряжена со значительными трудностями. Новые сорта отбирают среди гибридов от скрещивания тетраплоидных гетерозигот. Поэтому для гибридных популяций характерны широкая вариация признаков и сложный характер расщепления. Это существенно затрудняет отбор генотипов с желаемой комбинацией генов хозяйственно-ценных признаков, делает необходимым получение и испытание больших популяций гибридных семян для достижения положительного результата.

Многие признаки устойчивости к патогенам у картофеля определяются действием доминантных аллелей отдельных генов. Их эффект может проявляться в симплексном состоянии (*Aaaa*). При скрещивании устойчивого симплекса с неустойчивой формой (нуллиплексом – *aaaa*) в гибридном потомстве доля устойчивых генотипов составит 50% (расщепление 1:1). В случае использования в таких скрещиваниях дуплекса (*AAaa*) доля устойчивых форм будет составлять 5/6 (расщепление 5:1). В потомстве триплекса (*Aaaa*) или квадруплекса (*AAAA*) расщепление по устойчивости к патогену отсутствует. В связи с этим, в современной селекции картофеля перспективным считается создание специальных родительских линий с комплексом генов устойчивости к болезням и вредителям, у которых соответствующие гены представлены несколькими доминантными аллелями (мультиплексов) [3, 4]. Использование таких линий в скрещиваниях позволяет получать гибридные популяции, в которых генотипы, несущие гены устойчивости, встречаются с более высокой частотой, чем при скрещивании симплексных форм.

Создание мультиплексных родительских линий на тетраплоидном уровне, учитывая генетические особенности культурного кар-

тофеля, – весьма сложный процесс. Частота выщепления дуплексов в потомстве от скрещивания двух симплексных форм (каких большинство среди сортов картофеля) составляет лишь 25%, вероятность появления дуплексов по нескольким генам намного ниже [5]. В связи с этим, для целенаправленной селекции родительских линий, мультиплексных по комплексу генов устойчивости, большие перспективы имеет применение отбора на диплоидном уровне. На этом уровне благодаря более простому, чем на тетраплоидном уровне, наследованию признаков проще создавать линии с комплексом генов устойчивости к патогенам. Митотическая полиплоидизация, связанная с дубликацией генетического материала растений, позволяет получать дуплексные по комплексу генов формы на основе гетерозиготных по этим генам дигаплоидов. Если гены устойчивости у дигаплоидов в гомозиготном состоянии, у их тетраплоидных производных доминантные аллели будут представлены в виде квадруплексов, которые отобрать с помощью селекции на тетраплоидном уровне практически невозможно. Ускорить и упростить процесс создания мультиплексных линий по нескольким генам устойчивости позволяет использование ДНК-маркеров.

Митотическая полиплоидизация используется в селекции картофеля с середины XX-го века. Впервые она была предложена L.A. Dionne [6–8] и выполнялась методом колхицинирования побегов или клубневых проростков с последующей прививкой колхицинированных побегов на укорененные растения. В первых экспериментах по митотическому удвоению хромосом различных культур растений, в том числе картофеля, обработке полиплоидизирующими агентами подвергали в основном почки растущих растений, прорастающие семена. В настоящее время большинство исследователей отдает предпочтение обработке меристем растений, выращиваемых *in vitro*. Наиболее часто используемым полиплоидизирующим агентом остается колхицин [9]. По-видимому, одной из причин такого предпочтения агента является его пригодность и технологичность для использования в культуре *in vitro* благодаря сохранению активности после стерилизации автоклавированием [10].

В настоящей статье представлены результаты исследований, имеющих целью создание мультиплексных родительских линий картофеля с помощью митотического удвоения хромосом у выращиваемых *in vitro* растений диплоидных клонов, отобранных по комплексу ДНК-маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям.

Материалы и методы

В качестве исходного материала для митотического удвоения хромосом использовали выращенные в асептических условиях растения первичных дигаплоидов сортов Lyra (IGC 09/9.10, IGC 09/9.11), Saphir (IGC09/2.4, IGC 09/2.8), Лилея (IGC09/8.24) и вторичные дигаплоиды IGC 08/29.39, IGC 08/29.40, представляющие собой второе поколение беккрасса (BC2) диплоидных межвидовых гибридов, полученных при опылении высокофертильными дигаплоидами *Solanum tuberosum* аллотетраплоидного дикого вида картофеля *S. stoloniferum*. Эти образцы были отобраны на основании оценки продуктивности, признаков культурного картофеля и наличия комплекса ДНК-маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям. У каждого из отобранных генотипов было представлено не менее трех маркеров, наибольшее количество (6) выявлено у первичных дигаплоидов IGC 09/9.10, IGC09/8.24 и вторичных дигаплоидов IGC 08/29.39 и IGC 08/29.40. Вторичные дигаплоиды также имели, по данным многолетних испытаний, высокую полевую устойчивость к фитофторозу (8–9 баллов), которая, как показали данные ПЦР-теста, по-видимому, определяется наличием генов-гомологов *Rpi-blb1*, *Rpi-blb2* и *Rpi-blb3* [11].

Для митотического удвоения хромосом использовали пробирочные растения картофеля, выращиваемые на стандартной агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 1 мг/л индолил-масляной кислоты (ИМК) и 70 мг/л ретарданта роста растений хлорхолинхлорида [12], что способствовало формированию растений с укороченными междоузлиями и мощной корневой системой. Это позволило, с одной стороны, повысить жизнеспособность растений при неоднократном длительном воздействии колхицина и, с другой стороны, существенно сэкономить рабочий раствор полиплоидизирующего агента. Обработку растений проводили, заливая стерильный 0,025%-ный

водный раствор колхицина в пробирки до полного покрытия экспериментальных растений. Экспозиция составляла 72 ч при трехкратной замене рабочего раствора. Перед обработкой колхицином для стимуляции и синхронизации деления клеток пазушных почек применяли прижигание верхушек пробирочных растений горячим инструментом (снятие апикального доминирования) и трехкратное попеременное выдерживание растений (по 12 ч) на свету при комнатной температуре и в темноте при 4 °С. Обработывали от 20 до 72 пробирочных растений диплоидных линий. Обработанные колхицином растения отмывали от полиплоидизирующего агента несколькими сменами дистиллированной автоклавированной воды, затем черенковали по количеству живых пазушных почек (3–4 на растение). После 1–2 циклов размножения *in vitro* растения высаживали в грунт. Укоренившиеся жизнеспособные клоны высаживали в горшочки с торфогрунтом «Двина» (1 л) и выращивали с применением обычной агротехники [12]. Предварительную оценку их плоидности осуществляли методом подсчета числа хлоропластов в паре замыкающих клеток устьиц нижнего эпидермиса листьев. Эпидермис со свежесобранных листьев из среднего яруса куста фиксировали в ледяной уксусной кислоте, затем окрашивали 5%-ным спиртовым раствором йода [13]. Учитывали от 30 (при выравненной плоидности клеток) до 50 (при наличии клеток разного уровня плоидности) пар клеток. Тетраплоидными считали клетки с числом хлоропластов (в паре) более 20. Растения картофеля, в паре замыкающих клеток устьиц которых содержится 12–14 хлоропластов, считаются диплоидными, а с числом хлоропластов 18 и более – три- и тетраплоидными [14, 15].

Для отбора полиплоидных форм также применяли оценку скрещиваемости с тетраплоидными тестерами. В качестве материнских форм использовали растения клубневого поколения отобранных по числу хлоропластов клонов. Для опыления полиплоидных производных вторичных дигаплоидов IGC 08/29.39 и IGC 08/29.40 использовали пыльцу сортов Katahdin и Чараўник. В скрещиваниях с производными первичных дигаплоидов использовали пыльцу сортов Katahdin, Carlita, Gala и Манифест и смеси пыльцы нескольких сортов картофеля (приведены в примечании к табл. 3).

Для подтверждения дубликации генов *H1* и *Gro1-4* у IGC 08/29.39 в результате удвоения хромосом изучали расщепление по наличию ДНК-маркеров соответствующих генов в потомстве от скрещивания этого клона с сортом-тестером Katahdin, который является нуллиплексом по этим генам [16]. ПЦР-анализ осуществляли согласно методическим рекомендациям [17], тест проводили в соответствии с методикой, предложенной [16, 18].

Результаты и обсуждение

Выживаемость клонов картофеля после обработки колхицином

Для получения удвоенных клонов рекомендуют различные концентрации раствора колхицина. Они варьируют от 0,01 до 0,5% в зависимости от обрабатываемого материала (сухие или прорастающие семена, вегетативные органы размножения, например, клубни или луковицы, черенки, растения, выращиваемые *in vitro*) и вида растений [6–10, 15, 19–21 и др.]. Мы использовали концентрацию колхицина и экспозицию, рекомендованные L.A. Dionne [6–8] для клубневых проростков картофеля. Из-за крайне угнетенного состояния корневой системы после обработки колхицином, автор метода предлагал прививать их на необработанные укорененные растения. Обработка колхицином пробирочных растений позволяет защитить корневую систему от неблагоприятного воздействия мутагена, так как она окружена плотной агаризованной средой. Тем не менее, в условиях проведенного эксперимента (72-часовая экспозиция с использованием 0,025%-ного раствора колхицина) длительное пребывание в растворе колхицина приводило к потере части растений *in vitro*. Они теряли тургор, обесцвечивались и погибали после окончания действия агента. Средняя выживаемость исходных растений составила около 56% и была примерно одинакова для разных исходных генотипов. После черенкования на свежую питательную среду подвергнутые обработке колхицином растения проявили разный уровень выживаемости в зависимости от исходного генотипа (табл. 1). Нам не удалось получить ни одного жизнеспособного укоренившегося растения у одного из дигаплоидов сорта Луга (IGC 09/9.11) и дигаплоида сорта Лилея IGC 09/8.24. Тем не менее, после укоренения на питательной среде удалось вырастить до высадки в грунт более половины (54,1%) колхицинированных клонов.

Таблица 1

Эффективность митотического удвоения хромосом у диплоидных клонов картофеля

Диплоидные клоны	Количество обработанных колхицином растений, шт.	Количество растений, выживших до посадки в грунт		Количество клонов, отобранных по наличию 4х-клеток (в т.ч. содержащих исключительно 4х-клетки)	
		Шт.	%	Шт.	%
IGC 08/29.39	72	28	38,9	6 (0)	8,3 (0)
IGC 08/29.40	60	38	63,3	4 (0)	6,7 (0)
IGC0 9/9.10	58	48	82,5	36 (9)	62,1 (15,5)
IGC 09/9.11	22	0	0	–	–
IGC 09/2.4	32	30	93,8	7 (2)	21,9 (6,3)
IGC 09/2.8	40	28	70,0	3 (0)	7,5 (0)
IGC 09/8.24	34	0	0	–	–
Всего:	318	172	54,1	56 (11)	17,6 (3,5)

Более высокую, по сравнению с первичными дигаплоидами, жизнеспособность проявили клоны межвидовых гибридов (соответственно 49,3 и 51,1%). Однако незначительная выборка генотипов и присутствие среди оставшихся первичных дигаплоидов клонов с максимальным числом выживших растений не дают оснований для утверждения, что высокий уровень гетерозиготности, характерный для межвидовых гибридов, является более предпочтительным при отборе генотипов для обработки колхицином по сравнению с инбридированными первичными дигаплоидами картофеля.

Плоидность вегетативного потомства клонов картофеля, подвергнутого обработке колхицином

Наиболее простым и эффективным экспресс-методом определения плоидности растений картофеля является подсчет количества хлоропластов в паре замыкающих клеток устьиц [14, 15]. Он не настолько точен, как прямой подсчет числа хромосом в клетках меристем или при изучении мейоза материнских клеток пыльцы, однако незаменим при анализе больших выборок образцов. Кроме того, он может быть применен на ранних стадиях развития растений, обеспечивает первичный отбор генотипов с преобладанием полиплоидных клеток среди химерных по плоидности растений [21] (мозаичная, иначе секториальная, химерность является цитогенетической особенностью растений, подвергнутого обработке колхицином [22]). В силу того, что основная цель удвоения числа

хромосом у диплоидных клонов – получение тетраплоидов, способных к гибридизации с тетраплоидными сортами или селекционными клонами, у отобранных по числу хлоропластов растений необходимо произвести подсчет числа хромосом и оценить их скрещиваемость с тетраплоидными образцами картофеля. Лучше это делать для клубневых поколений колхицинированных клонов, так как для изначально химерных по плоидности растений характерна стабилизация уровня плоидности у вегетативного потомства [23, 24].

Основываясь на данной стратегии оценки плоидности, мы провели цитологическое изучение высаженных в грунт образцов и сделали первичный отбор растений с клетками тетраплоидного уровня (табл. 1). Данные о представленности клеток разного уровня плоидности у клонов, отобранных для гибридизации с тетраплоидными тестерами, представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 1, среди высаженных в грунт растений колхицинированных клонов преобладают миксоплоидные (с клетками разного уровня плоидности 2х–4х). При этом для колхицинированных межвидовых гибридов характерна меньшая частота встречаемости клеток тетраплоидного уровня, чем для первичных дигаплоидов (табл. 2). Среди межвидовых гибридов нам не удалось выделить ни одного клона, у которого бы клетки тетраплоидного уровня были преобладающими. Исключительно 4х-клетки или 4х и переходного 2х–4х уровня обнаружены у девяти кло-

Таблица 2

Представленность клеток разного уровня плоидности в колхицинированных клонах, отобранных для гибридизации с тетраплоидным тестером

Колхицинированные клоны	Количество клеток определенного уровня плоидности, шт.			Количество учтенных клеток, шт.
	2x	2x–4x	4 x	
IGC08/29.39-C14/6	39	11	0	50
IGC08/29.39- C14/25	29	7	7	43
IGC08/29.40-C14/35	29	9	7	45
IGC09/2.8-C15/6	3	11	34	48
IGC09/2.4-C15/7	0	8	40	48
IGC09/2.4-C15/11	0	0	37	37
IGC09/9.10-C15/2	3	12	31	46
IGC09/9.10-C15/6	0	7	33	40
IGC09/9.10-C15/14	2	5	38	45
IGC09/9.10-C15/15	0	2	44	46
IGC09/9.10-C15/25	2	6	50	58
IGC09/9.10-C15/30	1	4	41	46
IGC09/9.10-C15/35	0	5	42	47
IGC09/9.10-C15/40	0	0	29	29

нов, полученных на основе дигаплоида сорта Lyra IGC 09/9.10 (в табл. 2 приведен клон IGC09/9.10-C15/40), а также у двух клонов на основе дигаплоида сорта Saphir IGC09/2.4 (в табл. 2 – клон IGC09/2.4-C15/11). Пример клеток эпидермиса листа колхицинированных клонов различного уровня плоидности и мозаичной химеры представлен на рис. 1 (а–в).

Полученные нами результаты по выходу полиплоидизированных растений не вполне соответствуют данным, полученным другими авторами. Так, в работе [20] указывается, что частота удвоенных растений диких диплоидных видов выше, чем дигаплоидов *S. tuberosum*. В нашем случае максимальное число тетраплоидов получено у первичного дигаплоида сорта культурного картофеля Lyra, а среди межвидовых гибридов не выявлено ни одного с преобладанием клеток тетраплоидного уровня. В то же время частота появления тетраплоидных клонов среди оцененных нами по плоидности растений в целом согласуется с данными этих же авторов. В нашем случае она составила 6,4%, а в работе [20] она колебалась от 4,5 до 7,1 % в зависимости от генотипа. При этом частота появления миксоплоидов в нашем эксперименте оказалась гораздо выше.

Скрещиваемость колхицинированных клонов с тетраплоидными тестерами

Скрещивание колхицинированных клонов с тетраплоидными тестерами позволяет решить одновременно несколько задач. Во-первых, как указывалось выше, это один из способов определения плоидности генеративных тканей колхицинированных растений. Во-вторых, это способ отбора среди цитогенетически нестабильных генотипов фертильных образцов, перспективных для использования с целью передачи генетического материала диплоидов на тетраплоидный уровень. И, в-третьих, это, собственно, и есть способ переноса комплекса ценных генов, собранных на диплоидном уровне, к тетраплоидным гибридам. В 2015 году мы осуществили отбор клонов, перспективных в качестве удвоенных мультиплексных линий, среди клубневого потомства колхицинированных клонов межвидовых диплоидных гибридов. В сезон 2016 года проводили поиск таких линий среди потомства колхицинированных клонов первичных дигаплоидов *S. tuberosum*.

В 2015 году испытания проводили для пяти клонов IGC 08/29.39 и четырех клонов IGC 08/29.40. У одного из цитогенетически нестабильных клонов, происходивших от

IGC 08/29.39 (08/29.39-C14/25), оценку скрещиваемости осуществляли на растениях, выросших из трех разных клубней, с целью выявления возможности стабилизации ploидности при вегетативном размножении колхицинированных растений. Уровень функциональной фертильности пыльцы миксоploидных клонов межвидовых гибридов во всех случаях оказался недостаточным для использования их в скрещиваниях в качестве опылителей. У лучшего по этому показателю клона он не превышал 1,5%. С одной стороны, это может объясняться относительно невысоким уровнем фертильности исходных гибридов, имеющих цитоплазму дикого типа *S. stoloniferum*, наличие которой у межвидовых гибридов часто приводит к цитоплазматической мужской стерильности [26]. С другой стороны, известно, что обработка колхицином, как правило, приводит к анеуплоидии и другим хромосомным aberrациям, мутациям в отдельных генах, которые негативно сказываются на уровне фертильности [9, 19]. Судя по нашим данным, кардинальных хромосомных нарушений, которые вели бы к формированию преимущественно abortивной пыльцы у цветущих миксоploидов, по-видимому, нет. Несмотря на невысокий процент прорастающей *in vitro* пыльцы, доля в пыльце abortивных пыльцевых зерен также была незначительной (рис. 1г). Уровень функциональной фертильности отдельных колхицинированных клонов может быть сопоставим с фертильностью некоторых современных сортов картофеля, в частности с фертильностью одного из сортов, который мы пытались использовать в качестве опылителя (белорусский сорт Чараўник с фертильностью менее 3%).

В табл. 3 приведены результаты опыления миксоploидных клонов межвидовых гибридов высокофертильным сортом Katahdin (ФФП более 30%). Опыление низкофертильным сортом Чараўник во всех случаях оказалось безрезультатным, несмотря на сопоставимый с первым опылителем объем скрещиваний. Нам удалось выделить три клона, которые могут быть использованы в скрещиваниях с тетраploидными сортами: IGC08/29.39-C14/6, IGC08/29.39-C14/25-2 и IGC08/29.40-C14/35-1. Лучшую скрещиваемость с тетраploидами показал клон 08/29.39-C14/6, который по фенотипу в наибольшей степени отличался от исходной

диплоидной формы и был похож на тетраploидное растение (рис. 1д). Интересно, что у этого клона не было выявлено клеток с числом хлоропластов тетраploидного уровня (более 18). В то же время у него было много клеток устьиц с числом хлоропластов 16–18. По-видимому, при отборе колхицинированных растений не следует отбраковывать клоны с переходным числом хлоропластов при первоначальном цитологическом анализе, так как среди них могут оказаться образцы с увеличенным количеством полиploидизированных клеток в других эмбриональных слоях, к которым, в частности, относится эмбриональный слой генеративной сферы [22, 23]. Судя по данным скрещиваемости с тетраploидным тестером клубневого потомства колхицинированных растений, при получении полового потомства колхицинированных клонов желательно проводить гибридизацию с растениями, выросшими из разных клубней. По-видимому, в процессе вегетативного размножения происходит «расхимеривание» миксоploидов и стабилизация ploидности отобранных клубневых клонов. Известно, что подобное происходит и с соматическими гибридами картофеля, для которых также характерна цитогенетическая нестабильность, что негативно сказывается на их фертильности. После нескольких циклов клубневого репродуктивного происхождения происходит стабилизация ploидности и появляется возможность успешного скрещивания соматических гибридов с тетраploидным картофелем [24]. Мы наблюдали разный уровень скрещиваемости с тетраploидным тестером растений одного и того же миксоploидного клона (08/29.39-C14/25), выращенных из разных клубней. Так, при сопоставимом объеме скрещиваний у одного из трех клонов были получены семена (08/29.39-C14/25-2), а у двух (08/29.39-C14/25-2 и 08/29.39-C14/25-1) наблюдали только образование ягод с abortивными семенами.

В 2016 году скрещивания выделившихся по женской плодовитости митотически удвоенных клонов на основе межвидовых гибридов были повторены с использованием нескольких фертильных тетраploидных сортов. Также осуществлено опыление сортами-тестерами отобранных по ploидности митотически удвоенных клонов на основе первичных дигаploидов *S. tuberosum*. Результаты гибридизации приведены в табл. 3.

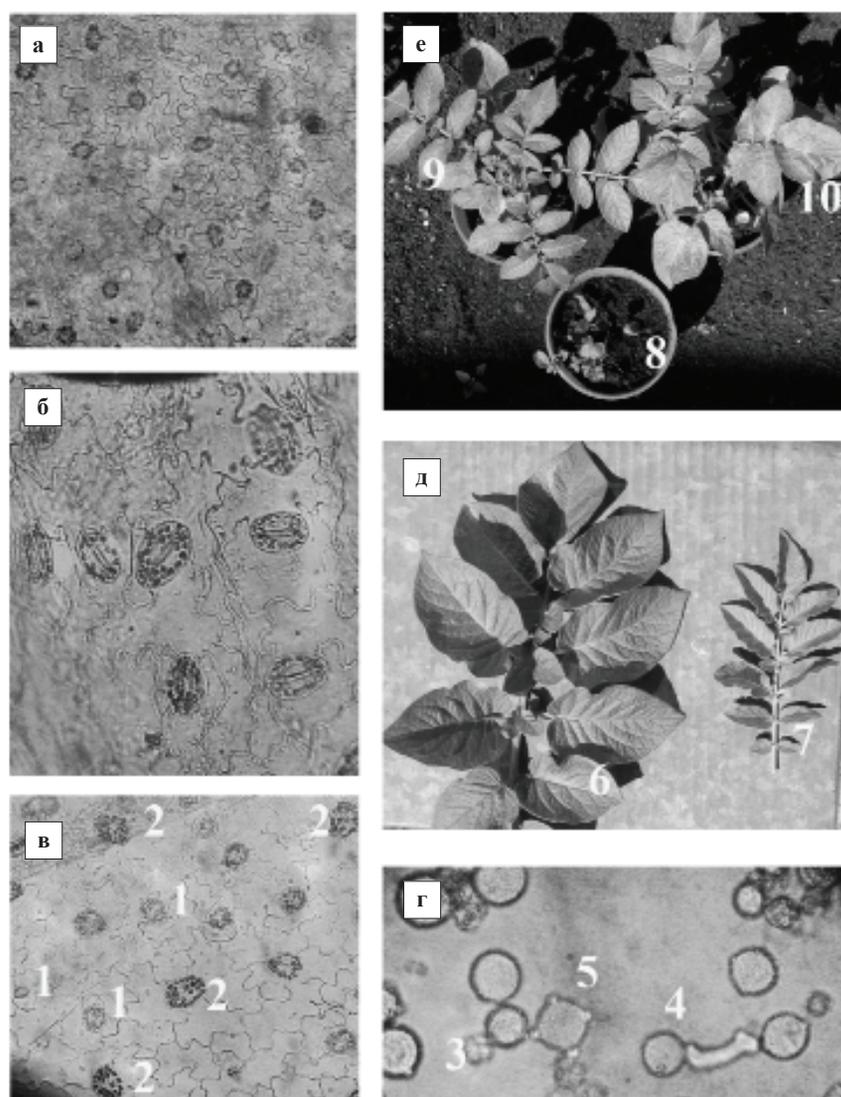


Рис. 1. Цитогенетические и морфологические особенности колхицинированных клонов картофеля.

А–в – количество хлоропластов в паре замыкающих устьичных клеток эпидермиса листа колхицинированных клонов: а – клон IGC09/2.8-C15/3 с 2х-клетками (увеличение $\times 1000$); б – клон IGC09/9.10-C15/35 с 4х-клетками (увеличение $\times 4000$); в – химерный по плоидности клон IGC 08/29.39-C14/19 с клетками уровня плоидности 2х, 4х и переходного 2х–4х (увеличение $\times 1000$); показаны клетки разного уровня плоидности: 1 – клетки с числом хлоропластов 9–14 (справа) и с числом хлоропластов 16–18 (в центре); 2 – клетки с числом хлоропластов более 18 (20–23);

г – проращение *in vitro* пыльцы митотически удвоенного клона IGC 08/29.39-C14/6: 3 – пример abortивной пыльцы (мелкая, лишенная цитоплазмы, неправильной формы); 4 – функционально фертильное пыльцевое зерно (прорастающее *in vitro*); 5 – пыльцевое зерно с характерными для тетраплоидного картофеля размерами и наличием четырех пыльцевых пор;

д – листовые пластинки: 6 – митотически удвоенного, скрещивающегося с тетраплоидным тестером клона IGC 08/29.39-C14/6; 7 – исходного диплоидного межвидового гибрида IGC 08/29.39 (2);

е – колхицинированные клоны первичного дигиплоида IGC IGC09/9.10 (сорт Lyra) в горшечной культуре: 8 – клон IGC09/9.10-17 с клетками исключительно диплоидного уровня (8–14 хлоропластов), т.е. не подвергшийся митотическому удвоению; 9 – клон IGC09/9.10-C15/40 с клетками исключительно тетраплоидного уровня (18 и более хлоропластов); 10 – химерный по плоидности клон IGC09/9.10-C15/2 с преобладанием клеток тетраплоидного (18 и более хлоропластов) и переходного уровня (16–18 хлоропластов). Клубневое поколение клона IGC09/9.10-C15/2 оказалось удовлетворительно цветущим и фертильным в качестве материнской формы в скрещиваниях с тетраплоидным тестером

Таблица 3

Результаты гибридизации между митотически удвоенными клонами и мужски фертильными сортами картофеля (Минск, 2015–2016 гг.)

Материнская форма	Опылитель	Опылений, шт.	Ягод, шт.	Семян, шт.	Семян на опыление, шт.
08/29.39-C14/6 *	Katahdin	39	3	129	3,3
08/29.39-C14/6	Carlita	6	1	0	0
08/29.39-C14/6	Манифест	19	0	0	0
08/29.39-C14/6	Mix1**	14	0	0	0
08/29.39-C14/6	Mix2	12	0	0	0
08/29.39-C14/6	Mix3	4	0	0	0
08/29.39-C14/25-2*	Katahdin	63	10	2	0,03
08/29.39-C14/25-2	Gala	7	0	0	0
08/29.39-C14/25-2	Carlita	19	1	0	0
08/29.39-C14/25-2	Манифест	36	0	0	0
08/29.39-C14/25-2	Mix1	32	0	0	0
08/29.40-C14/35-1*	Katahdin	21	2	17	0,8
08/29.40-C14/35-1	Carlita	15	0	0	0
08/29.40-C14/35-1	Манифест	27	0	0	0
08/29.40-C14/35-1	Mix2	14	0	0	0
08/29.40-C14/35-1	Mix1	20	0	0	0
08/29.40-C14/35-1	Mix3	37	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/2	Манифест	13	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/2	Mix1	14	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/2	Mix2	12	6	154	12,8
IGC-09/9.10-C15/2	Mix3	27	11	80	3,0
IGC-09/9.10-C15/6	Mix1	6	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/14		0	–	–	–
IGC-09/9.10-C15/16	Манифест	17	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/16	Katahdin	6	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/16	Carlita	6	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/16	Mix1	3	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/16	Mix2	1	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/25		0	–	–	–
IGC-09/9.10-C15/28	Carlita	7	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/30	Gala	6	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/35	Carlita	9	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/35	Манифест	10	0	0	0
IGC-09/9.10-C15/40	Манифест	4	0	0	0
IGC-09/2.4-C15/7		0	–	–	–
IGC-09/2.4-C15/11	Манифест	4	0	0	0

Продолжение табл. 3

Материнская форма	Опылитель	Опылений, шт.	Ягод, шт.	Семян, шт.	Семян на опыление, шт.
IGC-09/2.4-C15/11	Mix1	7	0	0	0
IGC-09/2.4-C15/11	Mix2	7	0	0	0
IGC-09/2.8-C15/6		0	–	–	–

* – результаты опыления 2015 года сортом Katahdin; ** – в качестве опылителя использованы смеси пыльцы мужски фертильных сортов: Mix1 (Katahdin, Чародей, Манифест); Mix2 (Чародей, Quarta, Дина); Mix3 (Katahdin, Чародей, Gala, Quarta)

Как видно из табл. 3, нам не удалось осуществить опыление митотически удвоенных клонов IGC-09/9.10-C15/14, IGC-09/9.10-C15/25, IGC-09/2.4-C15/7 и IGC-09/2.8-C15/6. При нормальном клубнеобразовании и относительно мощном габитусе растений цветение у них отсутствовало. Следует отметить, что уровень цветения и других клонов на основе первичных дигаплоидов картофеля был достаточно низким. Он существенно уступал уровню цветения удвоенных клонов межвидовых гибридов. Как правило, это были единичные цветки или кисти с тремя-четырьмя цветками и не более двух ярусов цветения, что не позволило реализовать большой объем скрещиваний. Исключением был клон IGC-09/9.10-C15/2 дигаплоида сорта Luga, уровень цветения которого соответствовал 3 баллам (достаточно продолжительное, в несколько ярусов цветение). Это позволило провести его опыление в разных комбинациях, в двух из которых было получено достаточно большое количество семян. В обеих удачных комбинациях использована смесь пыльцы фертильных сортов картофеля.

Известно, что обработка меристематических тканей растений колхицином ведет к множественным нарушениям, в том числе к появлению хромосомных aberrаций. Это сказывается на формировании генеративных клеток митотически удвоенных клонов, вызывая стерильность растений, отклонения в росте и развитии растений [19]. То есть, митотическое удвоение хромосом методом колхицинирования может быть причиной как низкой мужской фертильности, так и женской плодовитости. Причиной пониженной фертильности также может быть сохранение определенного уровня цитологической химерности различных эмбриональных слоев

клубневых поколений колхицинированных клонов: мериклиальной (мозаичности) или секториальной химерности, или различие плоидности между эмбриональными слоями (периклиальной химерности) [22].

Цитологический анализ плоидности колхицинированных клонов мы проводили на уровне слоя L1 (замыкающие клетки устьиц эпидермиса листа). Однако для успешной гибридизации имеет значение плоидность эмбрионального слоя L2 (генеративные клетки) [22]. Следовательно, тестерные скрещивания с тетраплоидным родителем позволяют отбирать цитогенетически стабильные или относительно стабильные тетраплоидные митотически удвоенные клоны и одновременно получать гибриды с их участием. Очевидно, к таковым относится клон IGC-09/9.10-C15/2, так как с его участием получено большое количество семян. Возможно, в дальнейшем по мере клубневого репродуцирования колхицинированных клонов удастся отобрать еще какое-то количество таких клонов.

Возникает вопрос, почему в скрещиваниях 2016 г. с участием колхицинированных клонов на основе межвидовых гибридов нам не удалось повторить успех, достигнутый в предыдущем году. В 2015 г. в качестве тетраплоидного тестера использовали сорт Katahdin. Этот сорт известен своей высокой функциональной мужской фертильностью, поэтому широко используется в качестве опылителя в селекционных программах. Его можно обнаружить в родословных многих современных сортов картофеля [27]. Однако скрещиваемость генотипов определяется не только фертильностью включенных в гибридизацию генотипов, но и их совместимостью [28, 29]. Последняя определяется составом аллелей S-гена материнской формы и опы-

лителя, разнообразие которых у культурного картофеля, как правило, невелико [29, 30]. Для успешных скрещиваний в пыльце должен присутствовать хотя бы один S-аллель, который отсутствует у материнской формы. В результате митотического удвоения хромосом происходит дупликация S-аллелей, присущих исходному диплоидному генотипу, что сужает разнообразие S-аллелей у полученных тетраплоидных клонов (максимальное их количество – два) по сравнению с тетраплоидными сортами (максимальное количество – 4). В литературе нет сведений о S-аллельном составе сорта Katahdin. Однако, судя по активному использованию его в селекции, можно предположить, что такое разнообразие у него достаточно широко, что и определяет его хорошую совместимость со многими сортами и гибридами картофеля. По-видимому, именно эта генетическая особенность сорта-тестера позволила нам осуществить успешную гибридизацию с митотически удвоенными клонами в 2015 году. В 2016 году в качестве опылителей были использованы другие сорта картофеля (Cargita, Gala, Манифест), отобранные не только в соответствии с их достаточно высокой мужской фертильностью, но и на основании присущего им комплекса хозяйственно-ценных признаков. В частности у них имеются важные гены устойчивости к патогенам, отсутствующие у сорта Katahdin [16, 18]. Очевидно, сорта, отобранные в качестве опылителей в 2016 году, не обладают достаточным S-аллельным разнообразием для

обеспечения совместимости с удвоенными дигаплоидами. Решению проблемы может способствовать использование в качестве опылителя смеси пыльцы нескольких сортов. Так, при гибридизации клона IGC-09/9.10-C15/2 с сортом Манифест завязывания семян не произошло, в то время как использование двух из трех вариантов смеси пыльцы оказалось результативным (табл. 3).

Подтверждение дупликации генов устойчивости к болезням и вредителям у митотически удвоенных клонов диплоидного картофеля

Количество семян гибридной популяции IGC 15/71.n, полученной при опылении митотически удвоенного клона IGC08/28.39-C14/6 тетраплоидным сортом-тестером Katahdin, позволило осуществить анализ наследования доминантных аллелей генов устойчивости к нематоду, присутствующих у исходного диплоидного гибрида и отсутствующих у сорта-тестера. Экспериментальная гибридная популяция включала более 30 семян, что, по мнению [5], достаточно для получения достоверных различий между симплексами, дуплексами и триплексами при анализе расщепления по изучаемым генам у тетраплоидов. Данные расщепления по ДНК-маркерам CP113 (к гену *HI*) и Gro1-4 (к гену *Gro1-4*) в гибридном потомстве митотически удвоенного клона представлены в табл. 4. На рис. 2 показаны примеры результатов ПЦР-анализа родительских образцов и гибридов расщепляющейся популяции по обоим маркерам.

Таблица 4

Характер расщепления по наличию ПЦР-маркеров к генам устойчивости к нематоду в гибридной популяции IGC 15/71.n от скрещивания митотически удвоенного клона IGC08/28.39-C14/6 с нуллиплексным по данным генам сортом Katahdin

ПЦР-маркер	Фактическое расщепление A:a	Теоретическое расщепление A:a	Значение χ^2	Уровень значимости p	Ген и его аллельное состояние
CP113	34:6	32,5:6,5 (5:1)	0,11	0,75	<i>HI</i> дуплекс
Gro1-4	16:6	18,33:3,67 (5:1)	1,78	0,2	<i>Gro1-4</i> дуплекс
		17,29:4,71* (3,67:1)	0,44	0,5	

* – с учетом хроматидного расщепления

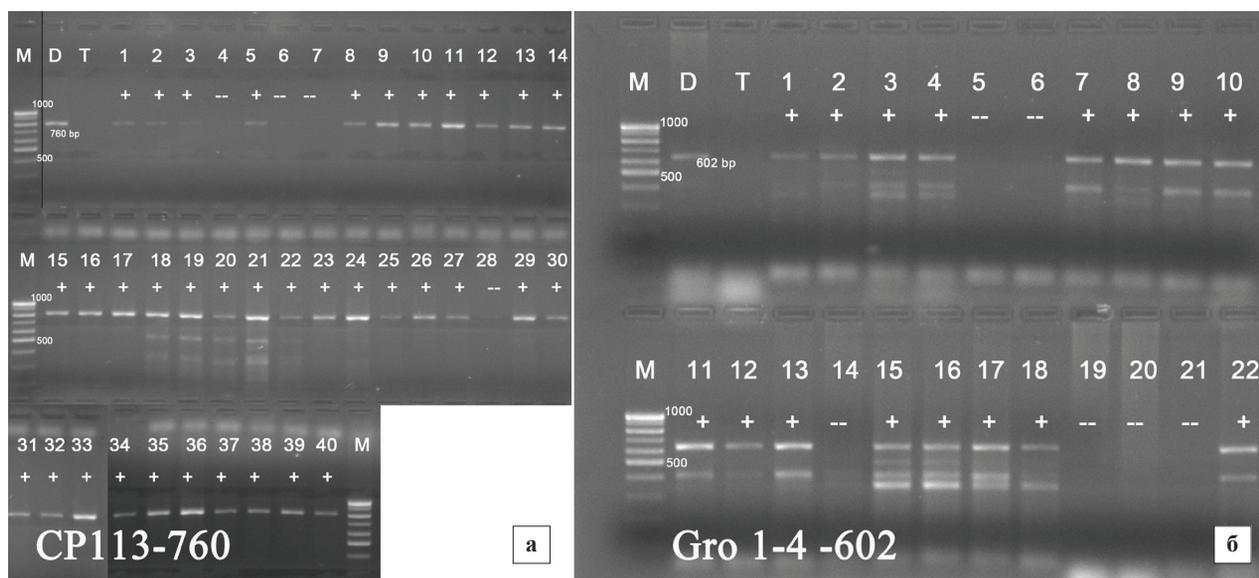


Рис. 2. Расщепление по наличию ПЦР-маркеров двух генов устойчивости к цистообразующей золотистой нематоды у исходных родительских форм: митотически удвоенного клона IGC08/28.39-C14/6 и сорта-тестера Katahdin и гибридов, полученных при их скрещивании: а – по маркеру CP113₇₆₀ гена *HI*; б – по маркеру Gro1-4₆₀₂ гена *Gro1-4*.

М – маркер молекулярного веса 100–1000 п.н. D – митотически удвоенный (doubled) клон гибрида IGC08/28.39-C14/6, Т – сорт-тестер Katahdin; 1–40 – гибриды D × Т IGC 15/71 п.; наличие ПЦР-маркера обозначено знаком «+», отсутствие маркера – знаком «-»

Как видно из данных табл. 4, расщепление по гену *HI* оказалось близким к 5:1, характерному для анализирующего скрещивания тетраплоидного дуплекса с нуллиплексом (*AAaa* × *aaaa*). Это подтверждает факт дубликации генов при митотическом удвоении хромосом гибрида IGC08/28.39, у которого, очевидно, данный ген представлен в гетерозиготном состоянии. В случае с геном *Gro1-4* наблюдали избыток рецессивных гомозигот, не позволяющий рассматривать полученное расщепление как 5:1. Однако оно также не соответствует 1:1, которое имело бы место при скрещивании симплекса с нуллиплексом (*Aa-aa* × *aaaa*) ($\chi^2 = 4,54$ при $p < 0,05$). Известно, что расщепление, обусловленное рекомбинацией хромосом, является лишь одной из форм наследования у тетраплоидов. Теоретически ожидаемое отношение 5 : 1 характерно для генов, расположенных близко к центромере. Оно может нарушаться в случае так называемого хроматидного расщепления. Хроматидное расщепление характерно для генов, локализованных достаточно далеко от центромеры, чтобы имел место регулярный кроссинговер. При этом обычно возникает избыток рецессивных

форм, например, 0,86А:1а, в анализирующих скрещиваниях симплексов. У дуплексов оно выглядит как 3,67:1 вместо ожидаемого 5:1 [31]. Экспериментально полученное нами расщепление близко к тому, что имеет место при хроматидном расщеплении. Таким образом, проанализированный нами колхицинированный клон является дуплексом по гену *Gro1-4*.

Кроме представленных выше маркеров к генам устойчивости к *G. rostochiensis*, у гибридов IGC08/28.39 и IGC08/28.40 также присутствуют маркеры генов устойчивости к L- и Y-вирусам картофеля, раку и фитофторозу. Устойчивость к фитофторозу у этих гибридов, полученных с участием мексиканского аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum*, определяется гомологами генов *Rpi-blb1*, *Rpi-blb2* и *Rpi-blb3*, которые обеспечивают высокую долговременную устойчивость к патогену [2, 11, 32]. Подобная комбинация генов до настоящего времени была интрогрессирована лишь в несколько экспериментальных генотипов картофеля с помощью генно-инженерных методов [32]. Высокую селекционную ценность имеет также первичный дигаплоид сорта Lyra IGC 09/9.10, митотически удвоенный клон которо-

го нам удалось скрестить с тетраплоидными сортами. По данным генотипирования, у него выявлены семь маркеров к генам устойчивости к болезням и вредителям (гены *HI* и *Gro1-4* устойчивости к золотистой цистообразующей нематоды, *Ryadg* устойчивости к Y-вирусу картофеля, *Rxadg* устойчивости к X-вирусу картофеля, два QTL, *PLRV1* и *PLRV4*, устойчивости к вирусу скручивания листьев, гены устойчивости к раку *Sen1* и фитофторозу *RI*). Таким образом, тетраплоидные родительские линии с дубликацией генов, представленных у этих форм, и способные скрещиваться с тетраплоидными сортами картофеля, представляют значительный интерес для селекции, так как передают значительной части потомства комплекс имеющихся у них генов устойчивости к важнейшим патогенам картофеля.

Заключение

В результате колхицинирования *in vitro* диплоидных клонов картофеля разного происхождения (беккроссы диплоидных межвидовых гибридов на основе мексиканского дикого аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum* и первичные дигаплоиды нескольких сортов *S. tuberosum*), отобранных по наличию у них комплекса ДНК-маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям, был получен ряд митотически удвоенных клонов. Цитологический анализ плоидности позволил выделить среди них образцы с тетраплоидными клетками. Несмотря на то, что значительная часть отобранных клонов имела скудное цветение и пониженный уровень мужской и женской фертильности, нам удалось скрестить в качестве материнских форм некоторые из удвоенных клонов с тетраплоидными сортами. Среди них – митотически удвоенный клон IGC 08/28.39-C14/6 на основе межвидового гибрида и клон IGC-09/9.10-C15/2 от первичного дигаплоида сорта Луга. Анализ расщепления по наличию ДНК-маркеров к генам устойчивости к нематоды у гибридов от скрещивания клон IGC 08/28.39-C14/6 с нуллиплексным по этим генам сортом Katahdin показал дуплексное состояние генов *HI* и *Gro1-4*. Это дает основание рассматривать его в качестве мультиплексной родительской линии, способной передавать значительной части потомства комплекс генов устойчивости к болезням и вредителям. Результаты исследо-

вания подтвердили возможность использования метода митотического удвоения хромосом у диплоидных линий картофеля, созданных в результате отбора на диплоидном уровне, для получения тетраплоидных мультиплексных родительских линий, перспективных для традиционной селекции картофеля.

Авторы статьи выражают благодарность за помощь в проведении экспериментов, результаты которых легли в основу данной статьи, Ольге Владимировне Свиточ.

Список использованных источников

1. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato / C. Gebhardt [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2006. – Vol. 112. – P. 1458–1464.
2. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans* / A. Haverkort [et al.] // *Potato Res.* – 2009. – Vol. 52. – P. 249–264.
3. Potato breeding with haploids and 2n gametes / S.J. Peloquin [et al.] // *Genome.* – 1989. – Vol. 31. – P. 1000–1004.
4. Свежинский, К. Создание исходного материала для селекции картофеля в Польше / К. Свежинский // *Картофель: селекция, семеноводство и технология возделывания.* – Минск : Ураджай, 1988. – С. 135–150.
5. Bradshaw, J.E. Breeding strategies for clonally propagated potatoes / J.E. Bradshaw, G.R. Mackay // *Potato genetics*; J.E. Bradshaw, G.R. Mackay (eds). – Wallingford (UK): CABI, 1994. – P. 109–132.
6. Dionne, L.A. A survey of methods for overcoming cross-incompatibility between certain series of the genus *Solanum* / L.A. Dionne // *Amer. Potato Journal.* – 1958. – Vol. 35. – P. 422–423.
7. Dionne, L.A. Studies on the use of *Solanum acaule* as a bridge between *Solanum tuberosum* and species in series *Bulbocostana*, *Cardiophyla* and *Pinnatisecta* / L.A. Dionne // *Euphytica.* – 1963. – Vol. 12. – P. 263–269.
8. Ross, R.W. Doubling the chromosome number of selected *Solanum* genotypes. / R.W. Ross, A.L. Dionne, R. Hougas // *Europ. Potato J.* – 1967. – Vol. 10. – P. 37–52.
9. Mitotic chromosome doubling of plant tissue *in vitro* / E. Dhooche [et al.] // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2011. – Vol. 104. – P. 359–373.

10. Zhang, J. Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis* / J. Zhang, M. Zhang, X. Deng // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2007. – Vol. 89. – P. 211–216.
11. Wang M. Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species. PhD-thesis / M. Wang; Wageningen Universiteit. – Netherlands, 2007. – 108 pp.
12. Воронкова, Е.В. Получение гаметоклонов из нередуцированной пыльцы в культуре *in vitro* пыльников сортов картофеля и их первичная оценка по урожайности и другим селекционно-ценным признакам / Е.В. Воронкова [и др.] / под ред. А.П. Ермишина. – Минск: Право и экономика, 2013. – 62 с.
13. Цитологическая и цитозембриологическая техника (для исследования культурных растений): методические указания / Л.И. Абрамова [и др.]; под ред. Л.И. Орел / Ленинград: ВИР им Н.И. Вавилова, 1982. – 77 с. (Электронная копия [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://cam.psn.ru> в Электронной библиотеке ЦАМ) – Дата доступа: 18.02.2016.
14. Kostrica, P. Possibilities of indirect determination of the ploidy in potato regenerants *in vitro* / P. Kostrica, J. Domkarova // *Rostlinna Viroba UZPI.* – 1993. – Vol. 39, N 2. – P. 139–148.
15. De Maine, M.J. Potato haploid technologies. Ch.2.35. / M.J. de Maine // *Doubled haploids production in crop plants. A Manual.* / Kluwer Academic Publishers; M. Maluszynsky, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejka eds. – USA, 2003. – P. 241–247.
16. Определение состава и аллельного состояния генов устойчивости к болезням и вредителям у родительских линий картофеля с помощью ДНК-маркеров / А.П. Ермишин [и др.] // *Генетика.* – 2016. – Т. 52, № 5. – С. 1–10.
17. Оценка исходного материала картофеля для селекции на устойчивость к болезням и вредителям с помощью специфических ПЦР-маркеров: методические рекомендации / А.П. Ермишин [и др.]; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: Право и экономика, 2010. – 60 с.
18. Оценка исходного материала картофеля по составу и аллельному состоянию генов устойчивости к болезням и вредителям с целью оптимизации подбора родительских форм для гибридизации: методические рекомендации / А.П. Ермишин [и др.]; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: Право и экономика, 2016 – 56 с.
19. Jones, J.R. A novel method for inducing polyploidy in *Rhododendron* seedlings / J.R. Jones, T.G. Ranney, T.A. Eaker // *J. Am. Rhododendron Soc.* – 2008. – Vol. 31. – P. 130–135.
20. Greplova, M. Intra- and inter-specific crosses of *Solanum* materials after mitotic polyploidization *in vitro* / M. Greplova, H. Polzerova, J. Domkarova // *Plant Breed.* – 2009. – Vol. 128. – P. 651–657.
21. De Maine, M.J. The results of colchicine treatment of dihaploids and their implications regarding efficiency of chromosome doubling and potato histogeny / M.J. De Maine, J.A. Fantes // *Potato Research.* – 1983. – Vol. 26. – P. 289–294.
22. Frandsen, N.O. Die Plastidenzahl als Merkmal bei der Kartoffel / N.O. Frandsen // *Theor. Appl. Genet.* – 1968. – Vol. 38. – P. 153–167.
23. Воронкова, Е.В. Пути повышения андрогенетической способности картофеля и генетические особенности андрорегенерантов: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.15 (генетика) / Е.В. Воронкова; Институт генетики и цитологии НАН БССР. – Минск, 1999. – 20 с.
24. Яковлева, Г.А. Соматическая гибридизация и клеточная селекция картофеля (*Solanum tuberosum* L.). / Г.А. Яковлева // *Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 3: Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия* / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларус. наука, 2012. – Гл. 4. – С. 217–250.
25. Pallais, N. Research on the physiology of potato sexual seed production / N. Pallais, N. Fong, D. Berrios // *Proc. int. conf. “Innovative methods for propagating potatoes”.* CIP Rep. 28th Planning Conf. – Lima: CIP, 1984. – P. 149–168.
26. Sanetomo, R. Cytoplasmic genome types of European potatoes and their effects on complex agronomic traits / R. Sanetomo, C. Gebhardt // *BMC Plant Biology.* – 2015. – Vol. 15. – P. 162–178.

27. Potato Pedigree Database [Электронный ресурс] / Wageningen UR Plant Breeding. – Режим доступа <http://www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree>. – Дата доступа 29.11.16.
28. Ермишин, А.П. Отбор на диплоидном уровне и манипуляции с пloidностью в селекции картофеля / А.П. Ермишин // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2007. – Т 7. – С. 21–43.
29. Ермишин, А.П. Несовместимость при межвидовой и внутривидовой гибридизации диплоидного картофеля и пути ее преодоления / А.П. Ермишин // Вести НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2001. – № 3. – С. 105–118.
30. Ермишин, А.П. Влияние общей и специфической скрещиваемости родительских форм на эффективность гибридизации дигаметоидов картофеля / А.П. Ермишин, А.В. Савчук, Н.В. Калашникова // Весті АН Беларусі. Сер. біял. навук. – 1997. – № 3. – С. 37–40.
31. Росс, Х. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы (Пер. с англ.) / Х. Росс / М.: Агропромиздат, 1989. – 183 с.
32. Haverkort, A.J. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh Project / A.J. Haverkort [et al.] // Potato Research. – 2016. – Vol. 40, N 1. – P. 1–32. – DOI 10.1007/s11540-015-9312-6.

E.V. Voronkova, V.I. Luksha, O.N. Gukasian, Yu.V. Polyukhovich, M.V. Zharych, A.P. Yermishin

USE OF MITOTIC POLYPLOIDIZATION *IN VITRO* FOR PRODUCTION OF POTATO MULTIPLEX PARENTAL LINES

Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

In vitro colchicine treatment of diploid potato clones with a complex of resistance genes resulted in the production of a set of mitotically doubled clones. In spite of cytogenetic instability and reduced male and female fertility of the selected clones, we were able to produce the generative progeny in crosses between some of them and tetraploid varieties. The mode of inheritance of DNA-markers of PCN resistance genes in hybrids between doubled clone IGC 08/28.39-C14/6 and Katahdin variety that is the nulliplex for these genes indicates the duplex state of the genes. It makes it possible to consider this clone as the multiplex parental line that is prospective for breeding potato varieties with combined resistance to pests and diseases.

Key words: potato, dihaploids, mitotic polyploidization, multiplex lines, resistance genes

Дата поступления статьи 5 января 2017 г.

А.М. Шишлова-Соколовская¹, О.Ю. Урбанович¹, И.В. Федосеева², Г.Б. Боровский²

ТРАНСФОРМАЦИЯ *NICOTIANA TABACUM* КОНСТРУКЦИЕЙ, НЕСУЩЕЙ ГЕН *NDB2* ИЗ *ARABIDOPSIS THALIANA* В АНТИСМЫСЛОВОЙ ОРИЕНТАЦИИ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: s_anastasia78@mail.ru

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

Методом агробактериальной трансформации листовых дисков линии табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1* были получены трансгенные растения поколения T₀ с жизнеспособным семенным потомством. В качестве целевого гена был использован ген «внешней» нефосфорилирующей NADH-дегидрогеназы (*ndb2*) из *Arabidopsis thaliana*. Перенос данного гена осуществлялся посредством рекомбинантного штамма *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. В область T-ДНК штамма *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 методом трехродительского скрещивания была перенесена плаزمида pBI121_antiNDB2, несущая ген *ndb2* в антисмысловой ориентации, под контролем конститутивного 35S РНК CaMV промотора и нопалин-синтазога терминатора NOS, а также селективный ген *nptII* под контролем *nos*-промотора. Методом ОТ-ПЦР была показана транскрипционная активность гена *ndb2* в трансгенных растениях поколения T₀.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1*, ген *ndb2*, полимеразная цепная реакция (ПЦР), обратнo-транскрипционная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР), АФК (активная форма кислорода).

Введение

Различные абиотические стрессы, такие как холод, засуха, засоление, затопление, воздействие критических температур, токсические концентрации тяжелых металлов, высокая кислотность или щелочность почв, повышенное содержание озона, дефицит элементов минерального питания и т.д., снижают продуктивность сельскохозяйственных растений в два раза и более, а при высокой интенсивности и достаточно долгой продолжительности стресса приводят их к гибели [1, 2].

Для растений в стрессовом состоянии характерна дезинтеграция полирибосом, что приводит к нарушению синтеза полипептидов. Происходит образование «стрессовых гранул», функцией которых предположительно является приостановка синтеза неспецифических белков и защита матричной РНК от повреждения стрессовыми факторами [3].

Сложность селекционной работы по повышению устойчивости к абиотическим стрессам состоит в наличии большого комплекса

генов, контролирующих реакцию растений на абиотические стрессы, многие из этих генов к тому же характеризуются сложной регуляцией [4–7].

Важной особенностью ответной реакции растения на стрессовый фактор является изменение напряженности энергетического обмена. Митохондрии являются одной из главных мишеней окислительного повреждения при стрессе. При энергозапасующем окислении NADH митохондриями функционирует комплекс I дыхательной цепи. В состоянии стресса цитохромный путь дыхания (комплекс I) снижается и возрастает альтернативный путь (комплекс II). В результате такого переключения в клетках растений начинают функционировать альтернативные (второго типа, или NDII) внешние и внутренние NAD(P)H-дегидрогеназы, которые поставляют восстановительные эквиваленты в дыхательную цепь, минуя комплекс I. При этом происходит увеличение транскриптов и, как следствие, количества зрелого белка альтернативной ок-

сидазы (АО), что в свою очередь приводит к коэкспрессии ретенон-нечувствительных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ (НАД(Ф)Н-ДГ II типа) [8–10]. У растений арабидопсиса обнаружены три группы НАД(Р)Н-дегидрогеназ: NDA, NDB и NDC [11]. Белки NDB1–NDB4 являются внешними и обращены на внешнюю сторону внутренней митохондриальной мембраны, белки NDA1, NDA2, NDC1 обращены на внутреннюю сторону митохондриальной мембраны [12].

Точные физиологические функции белков семейства NDII не выяснены. Считается, что последние вместе с альтернативной оксидазой (АОХ) участвуют в формировании нефосфорилирующей дыхательной цепи при окислительном стрессе. Предполагается, что роль внешних и внутренних НАД(Р)Н-дегидрогеназ заключается в подавлении генерации АФК [8].

Показано, что в прорастающих семенах гороха сохраняется способность митохондрий к окислению экзогенного НАДН при действии отрицательной температуры, и именно окисление внешнего НАДН главным образом обеспечивает энергетический метаболизм при низких температурах у растений. После действия закаливающей отрицательной температуры на проростки озимой пшеницы была выявлена повышенная способность АОХ к транспорту электронов, что связано с высокой активностью внешней NDII. Внешняя НАД(Р)Н-дегидрогеназа в данном случае играет важную роль в поддержании функционального состояния митохондрий в гетеротрофных тканях растений при действии отрицательных температур [13].

Одним из способов изучения физиологических функций белков семейства NDII могут быть методы генетической инженерии. Используя данные методы можно блокировать синтез как всех белков семейства NDII, так и каждого в отдельности. Однако при выключении всего комплекса белков семейства NDII невозможно получить жизнеспособное семенное потомство. В работах Wallström показано, что удалось получить растения с подавленным синтезом отдельных белков данного семейства [14]. В растениях арабидопсиса с помощью RNAi был уменьшен синтез NDB4, вследствие чего значительно увеличился синтез NDB2 и АОХ1а, что привело к уменьшению

образования АФК клетками, солеустойчивости, изменениям в скорости развития и фенотипе растений. Кроме того, показано участие «внешней» НАДН-дегидрогеназы в развитии морозоустойчивости у проростков озимой пшеницы [14, 15].

Большой интерес представляет белок NDB2. Физиологические функции данного белка окончательно не выяснены. Предполагается, что данный белок участвует в процессах устойчивости растений к окислительному, низкотемпературному и другим абиотическим стрессам. В экспериментах по изменению уровня синтеза белка NDB4 с помощью RNAi было показано значительное увеличение синтеза белков NDB2 и АОХ1а.

Целью данного исследования является получение генетически модифицированных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих ген «внешней» нефосфорилирующей НАДН-дегидрогеназы (*ndb2*) из *Arabidopsis thaliana* в антисмысловой ориентации. Предполагается, что ген «внешней» нефосфорилирующей НАДН-дегидрогеназы (*ndb2*) посредством изменения количества АФК влияет на функционирование митохондрий, экспрессию генов, вовлеченных в стрессовый ответ, реализацию программы стресс-сигналинга и адаптации растений к стрессовым факторам.

Материалы и методы

Растительный материал

В качестве объекта для изучения функции гена *ndb2* использовалась линия табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1*. На основе данной линии были созданы трансгенные растения, несущие в геноме ген *ndb2* в обратной ориентации.

Создание векторных конструкций

Источником для клонирования нативного гена *ndb2* служили растения *Arabidopsis thaliana* (экотип Columbia).

Выделение мРНК и синтез кДНК выполняли с помощью наборов GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit и RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, EU).

При создании векторной конструкции использовали методики ПЦР, рестрикции и лигирования фрагментов ДНК, выполненные

по стандартным протоколам коммерческих наборов реагентов (Thermo Fisher Scientific, Qiagen) [16, 17]. Соответствие клонированной последовательности гена целевой последовательности гена *ndb2* подтверждено с помощью рестрикционного анализа.

Векторная конструкция для трансформации растений, получившая название pBI121_antiNDB2, создана на основе вектора pBI121 Савчиным Д.В. [18, 19]. Предварительно в данный вектор были введены дополнительные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Vam*HI и *Kpn*I для клонирования целевого гена в обратной ориентации между конститутивным промотором 35S РНК CaMV и терминатором нопалин-синтазы *nos*.

Рекомбинантные штаммы с целевой векторной конструкцией pBI121_antiNDB2 получены на основе агробактериального штамма *A. tumefaciens* ЕНА105 методом трехродительского скрещивания. Отбор агробактериальных клонов с целевой векторной конструкцией проводили на питательной среде с добавлением селективных агентов канамицина (100 мг/л) и рифампицина (50 мг/л). Наличие векторной конструкции в агробактериальных штаммах подтверждали методом ПЦР со специфичными праймерами, комплементарными гену *ndb2* в обратной ориентации. Полученные штаммы использованы в экспериментах по агробактериальной трансформации растений.

Агробактериальная трансформация

В качестве объекта для стабильной интеграции и изучения эффективной работы конструкции pBI121_antiNDB2 использовалась линия табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1*. Введение гена *ndb2* осуществлялось посредством агробактериальной трансформации листовых дисков 3–4-недельных растений табака, выращенных в асептических условиях (температура 24 °С, освещенность 4000–5000 люкс при 16/8 (свет/темнота) фотопериоде). В качестве переносчика Т-ДНК использовался агробактериальный штамм *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105. Для инициации процессов морфогенеза и отбора первичных трансформантов использовали питательные среды CIM, SIM и T-med с селективным агентом канамицином в концентрации 50 мг/л.

Молекулярно-генетический анализ

Выделение растительной ДНК выполняли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, EU) по методике изготовителя. Интеграцию чужеродных генов в растительный геном определяли с помощью ПЦР. Объем смеси для амплификации одного образца составлял 25 мкл, в смесь входили следующие реагенты: 100–200нг ДНК, 2,5мкл 10X буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ фирмы (Thermo Fisher Scientific, EU), 2,5мкл 10мМ смеси нуклеотидов (dNTP) (Thermo Fisher Scientific, EU), 2мкл 25мМ MgCl_2 (Thermo Fisher Scientific, EU), 2,5мкл каждого из праймеров, 0,2мкл 5ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, EU), 10,7мкл H_2O . Для идентификации присутствия целевого гена *ndb2* в антисмысловой ориентации использовали специфические праймеры: antiNDB2-F – GAGCTC GGATCCTCAGATGCTACTGGAATCTCTAC и antiNDB2-R – GAGCTCGGTACCATGAGA AATTTCAGTGTCTTCG. Подбор праймеров осуществлялся с помощью программы NSBI Primer-BLAST.

Амплификацию проводили в амплификаторе Bio-Rad с использованием следующей программы: 94 °С – 5 мин; 94 °С – 30 с, 51 °С – 30 с, 72 °С – 3 мин, 30 циклов; 72 °С – 7 мин; 4 °С – ∞ мин. Продукт реакции разделяли в 1%-ном агарозном геле с бромистым этидием в электрическом поле с помощью камеры для горизонтального электрофореза фирмы Bio-Rad. Фрагмент после электрофореза визуализировали с помощью системы Bio-Rad Gel Doc 2000.

Для доказательства транскрипции гена *ndb2* в трансформантах табака был использован метод обратно-транскрипционной ПЦР (ОТ-ПЦР). Для этого выделяли тотальную РНК с помощью набора реагентов GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, EU) по методике изготовителя. Синтезирование кДНК на матрице РНК осуществлялось с помощью набора реагентов First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, EU) по методике изготовителя. Дальнейший ПЦР-анализ на основе синтезированной к-ДНК, комплементарной мРНК, проводили в амплификаторе Bio-Rad с использованием программы, описанной выше. Продукт реакции разделяли в 1%-ном агарозном геле с бромистым этидием в элек-

трическом поле с помощью камеры для горизонтального электрофореза фирмы Bio-Rad. Фрагмент после электрофореза визуализировали с помощью системы GelDoc2000 Bio-Rad.

Результаты и обсуждение

Нуклеотидная последовательность гена *ndb2* из *Arabidopsis thaliana* (NM_116741.3, база данных NCBI) и базовый вектор pBI121 были использованы для создания плазмиды pBI121_NDB2, содержащей ген *ndb2* в прямой ориентации [19]. Базовый вектор pBI121 является удобной моделью для создания генетических конструкций, так как содержит LB- и RB-концевые повторы области T-ДНК, по которым происходит интеграция области T-ДНК в геном растения. На основе плазмиды pBI121_NDB2 была создана генетическая векторная конструкция pBI121_antiNDB2, несущая ген *ndb2* в антисмысловой ориентации. Из плазмиды pBI121_NDB2 ген *ndb2* был вырезан по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I. Далее, используя методы молекулярно-генетического клонирования, нуклеотидная последовательность гена *ndb2* была инвертирована и встроена по сайтам рестрикции описанных выше эндонуклеаз (рис. 1).

Генетическая конструкция pBI121_antiNDB2 содержит гетерологичный ген *ndb2* в антисмысловой ориентации под контролем конститутивного 35S РНК CaMV промотора и нопалин-синтазного терминатора NOS, селективный ген *nptII* под контролем *nos*-промотора. Ген *nptII* позволяет проводить отбор устойчивых к канамицину первичных трансформантов.

Создание трансгенных растений табака с геном *ndb2* в антисмысловой ориентации

Для создания трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1*, несущих в своем геноме ген *ndb2* в обратной ориентации, была использована векторная конструкция pBI121_antiNDB2. На первом этапе на основе агробактериального штамма *A. tumefaciens* EHA105 были получены рекомбинантные клоны с целевой векторной конструкцией методом трехродительского скрещивания. Отбор агробактериальных клонов, несущих ген *ndb2* в обратной ориентации в составе векторной конструкции, проводили на питательной среде LB с добавлением селективных агентов канамицина (100 мг/л) и рифампицина (50 мг/л). Наличие целевой вставки подтверждали методом ПЦР со спе-

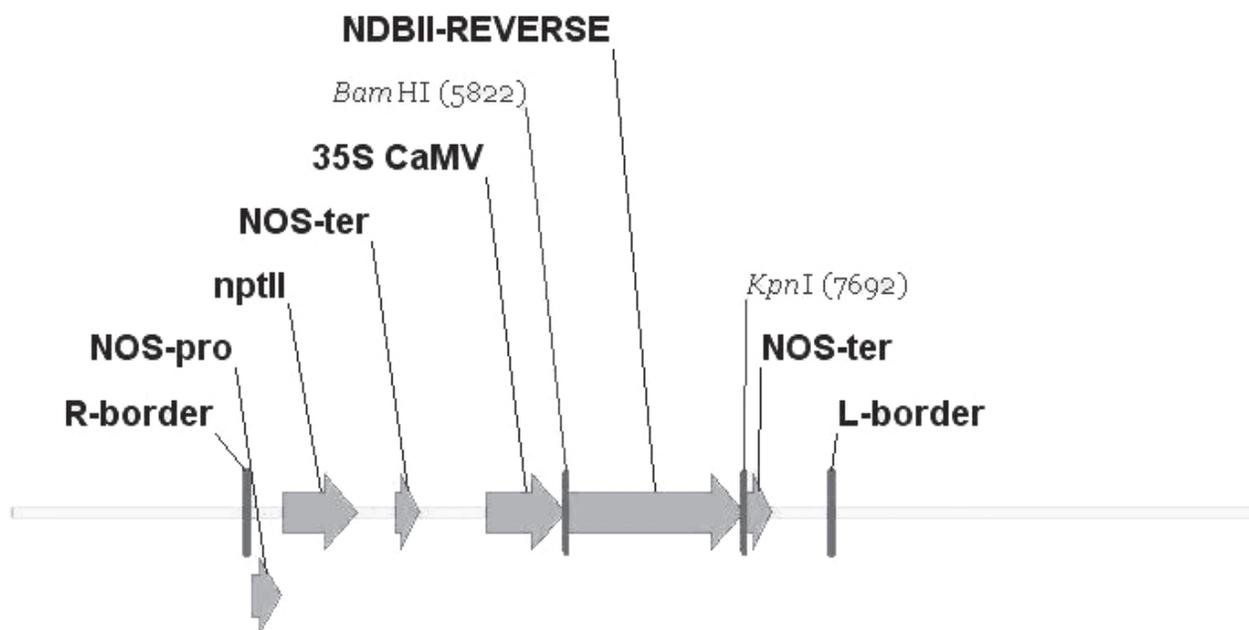


Рис. 1. Схема векторной конструкции pBI121_antiNDB2: R-border, L-border – правый и левый концевые повторы области T-ДНК; NOS-pro – промотор нопалин-синтазы; *nptII* – ген неомизинфосфотрансферазы II типа; NOS-ter – терминатор нопалин-синтазы; 35S CaMV – 35S РНК CaMV промотор; NDBII-REVERSE – ген «внешней» нефосфорилирующей НАДФ-Н дегидрогеназы в антисмысловой ориентации; *Bam*HI, *Kpn*I – сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции

цифичными праймерами (рис. 2). Полученные рекомбинантные штаммы использовали в дальнейшем в экспериментах для агробактериальной трансформации растений табака.

В результате эксперимента по агробактериальной трансформации растений табака векторной конструкцией рВ1121_antiNDB2 получено 68 регенерантов, из которых 40 укоренились на среде для ризогенеза с селективным агентом канамицином в концентрации 50 мг/л (рис. 3).

Экспрессия селективного гена *nptII* не всегда свидетельствует о вставке и транскрипционной активности целевого гена [20]. В нашем случае инициация процессов морфогенеза и ризогенеза у трансформантов на селективной среде, содержащей канамицин, не является достоверным фактом инсерции и транскрипции гена *ndb2* в обратной ориентации. В связи с этим, для подтверждения интеграции и экспрессии целевого гена *ndb2* был проведен молекулярно-генетический анализ.

Молекулярно-генетический анализ трансгенных растений с геном *ndb2*

Для молекулярно-генетического анализа использовали ДНК первичных трансформантов. Наличие гетерологичной инсерции определяли методом ПЦР с праймерами antiNDB2F и antiNDB2R (рис. 4).

С помощью ПЦР-анализа было отобрано 34 растения табака, в геноме которых подтверждено присутствие целевой вставки.

Полученные результаты демонстрируют эффективность созданной векторной конструкции рВ1121_antiNDB2. Агробактериальная трансформация листовых дисков данной конструкцией приводит к переносу целевой последовательности, несущей ген *ndb2* в обратной ориентации под контролем промотора 35S РНК СаMV, в геном растений табака.

Следует отметить, что наличие инсерции чужеродного гена в реципиентный геном не является фактом его транскрипционной активности. На эффективность экспрессии чужеродного гена огромное влияние оказывает место его интеграции в геном растения. Интеграция Т-ДНК в растительный геном происходит по типу негомологичной рекомбинации и не всегда обеспечивает стабильное фенотипическое проявление признака. Такая генетическая нестабильность может быть связана как с делецией

или мутацией введенной ДНК [21, 22], так и с инактивацией трансгена [23]. Механизмы замолкания трансгена могут быть различными, но основным из них является инактивация экспрессии трансгенов на транскрипционном на посттранскрипционном уровнях [24].

С целью подтверждения экспрессии гетерологичного гена в растительном геноме проведен ОТ-ПЦР-анализ. В ходе амплификации кДНК с праймерами, соответствующими целевому гену *ndb2* в антисмысловой ориентации, был выявлен фрагмент, соответствующий позитивному контролю (плазмида рВ1121_antiNDB) и теоретически ожидаемому размеру ампликона 1884 п.н. В негативном контроле (кДНК нетрансгенных растений) фрагмент отсутствовал (рис. 5).

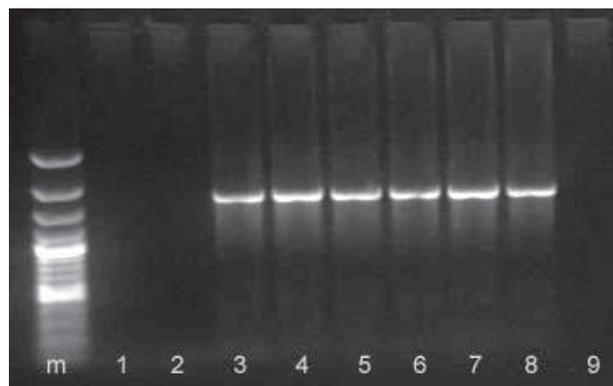


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продукта (1884 п.н.), выявленного при амплификации ДНК агробактериальных рекомбинантных штаммов с векторной конструкцией рВ1121_antiNDB2:

m – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific, EU); 1–8 – плазмидная ДНК рекомбинантных штаммов; 9 – смесь ПЦР-реагентов



Рис. 3. Первичный трансформант табака на селективной среде

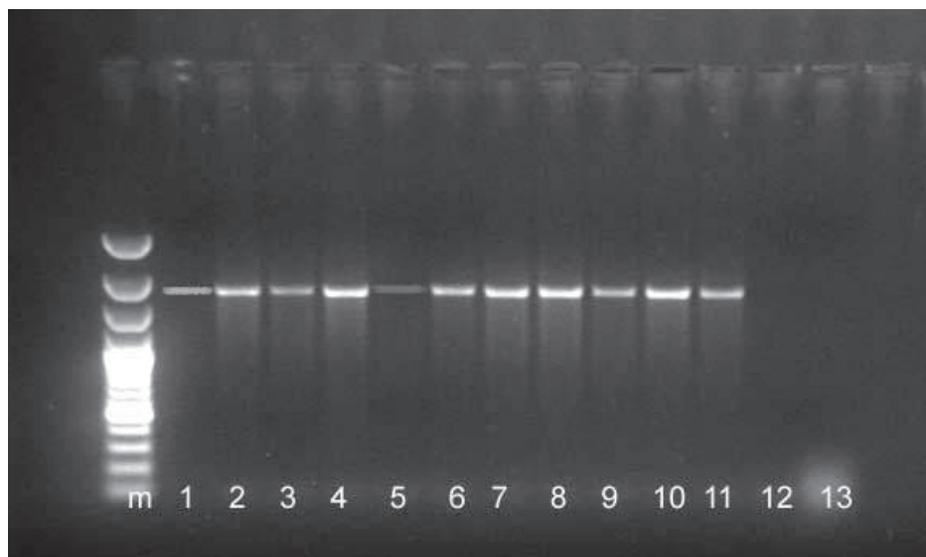


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продукта (1884 п.н.), выявленного при амплификации ДНК регенерантов табака со вставкой гена *ndb2* в обратной ориентации:

m – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific, EU); 1– плазмида pBI121_antiNDB2; 2–11 – анализируемые трансгенные линии; 12 – исходные растения табака; 13 – смесь ПЦР-реагентов

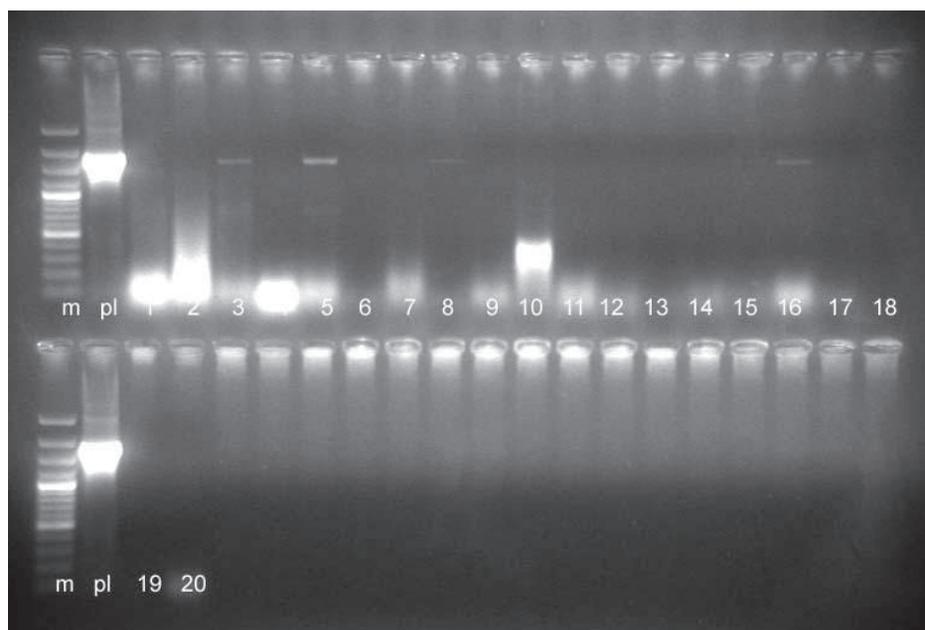


Рис. 5. Электрофореграмма ПЦР-продукта (1884 п.н.), выявленного при амплификации кДНК регенерантов табака, экспрессирующих ген *ndb2* в обратной ориентации:

m – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific); pl – плазмида pBI121_antiNDB2; 1–16 – анализируемые трансгенные линии; 17, 18 – исходные растения табака; 19 – смесь реагентов синтеза кДНК; 20 – смесь ПЦР-реагентов

Присутствие целевого фрагмента подтверждает факт транскрипции чужеродного гена в растительном геноме. Растения поколения T₀, экспрессирующие ген *ndb2* в антисмысловой ориентации, дали жизнеспособное семенное

потомство. Полученные трансгенные растения будут являться объектом для изучения влияния данного гена на механизмы развития устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам.

Заключение

Методом агробактериальной трансформации получены трансгенные растения табака, несущие в геноме гетерологичный ген *ndb2* из *Arabidopsis thaliana* (экотип Columbia) в анти-смысловой ориентации. С помощью методов ПЦР и ОТ-ПЦР показано, что посредством векторной конструкции pBI121_antiNDB2 осуществляется перенос, инсерция гетерологичной вставки и экспрессия целевого гена *ndb2* в обратной ориентации в растительном геноме.

Полученные трансгенные растения и их биохимический и молекулярно-генетический анализ позволят пролить свет на реализацию программы стресс-сигналинга и адаптационные механизмы устойчивости растительного генома к биотическим и абиотическим стрессовым факторам.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов БРФФИ Б16Р-050 и РФФИ №16-54-00070.

Список использованных источников

1. Boyer, J.S. Plant productivity and environment / J.S. Boyer // Science. – 1982. – Vol. 218. – P. 443–448.
2. Bray, E.A. Responses to abiotic stresses / E.A. Bray, J. Bailey-Serres, E. Weretilnyk; eds. W. Gruissem, B. Buchannan, R. Jones // Biochemistry and molecular biology of plants. – Amer. Soc. Rockville, 2000. – P. 1158–1249.
3. Al Khatib, K. High temperature effects on photosynthetic processes in temperate and tropical cereals / K. Al Khatib, G.M. Paulsen // Crop Sci. Soc. Amer. – 1999. – Vol. 39. – P. 119–125.
4. Kratsch, H.A. The ultrastructure of chilling stress / H.A. Kratsch, R.R. Wise // Plant Cell Environ. – 2000. – Vol. 23. – P. 337–350.
5. Plant cellular and molecular responses to high salinity / P.M. Hasegawa [et al.] // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2000. – Vol. 51. – P. 463–499.
6. Differential expression of two *_1_pyrroline_5_carboxylate* synthetase genes controlling proline accumulation during salt stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis* / N. Strizhov [et al.] // Plant J. – 1997. – Vol. 12. – P. 557–569.
7. Thomashow, M.F. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance / M.F. Thomashow // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 118. – P. 1–7.
8. Moller, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I. Moller // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol. 52. – P. 561–591.
9. Finnegan, P.E. Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants / P.E. Finnegan, K.L. Soole, A.L. Umbach // In Plant Mitochondria: From Genome to Function. – Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. – P. 163–230.
10. Svensson, A.S. Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves / A.S. Svensson, A.G. Rasmusson // Plant J. – 2001. – Vol. 28. – P. 73–82.
11. Light regulation of the *Arabidopsis* respiratory chain. Multiple discrete photoreceptor responses contribute to induction of type II NAD(P)H dehydrogenase genes / M.A. Escobar [et al.] // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 136 (1). – P. 2710–2721.
12. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants / A.H. Millar [et al.] // Annu. Rev. Plant Biol. – 2011. – Vol. 62. – P. 79–104.
13. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы / О.И. Грабельных [и др.] // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 6. – С. 645–660.
14. Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport / S. Wallström [et al.] // Plant & Cell Physiol. – 2014. – Vol. 55. N 5. – P. 881–896.
15. Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress / C. Smith [et al.] // Plant Cell Phys. – 2011. – Vol. 52. – P. 1222–1237.
16. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, D.W. Russell. – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. – 2344 p.

17. Ausubel, F.M. Current protocols in molecular biology / F.M. Ausubel. – New York: Greene Pub. Assoc. and Wiley-Interscience, 2004. – 561 p.
18. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants / P.-Y. Chen [et al.] // Mol. Breeding. – 2003. – Vol. 11, N 4. – P. 287–293.
19. Создание трансгенных растений *Nicotiana tabacum* с геном *ndb2 Arabidopsis thaliana* для изучения влияния на стресс / Д.В. Савчин [и др.] // Известия: сер. биол. наук. – 2017. – № 1. – С. 54–61.
20. Маренкова, Т.В. Мозаичный характер экспрессии трансгенов у растений / Т.В. Маренкова, Д.Б. Логинова, Е.В. Дейнеко // Генетика. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 293–306.
21. Kim, Y.S. Frequent occurrence of transgene deletion in transgenic plants / Y.S. Kim, J. Lee, S.-H. Jun // Mol. Cells. – 1998. – Vol. 8. – P. 705–708.
22. Frequent spontaneous deletions of Ri T-DNA in *Agrobacterium rhizogenes* transformed potato roots and regenerated plants / C.H. Hanisch ten Cate [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1990. – Vol. 14. – P. 735–741.
23. Курочкина, С.Д. Генетическая трансформация растений, процессы рекомбинации и регуляции экспрессии генов у трансгенных растений / С.Д. Курочкина, Н.А. Картель // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1998. – № 4. – С. 3–12.
24. Маренкова, Т.В. Трансгенные растения как модели для изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов / Т.В. Маренкова, Е.В. Дейнеко // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19., № 5 – С. 545–551.

А.М. Shishlova-Sokolovskaya¹, О.Ю. Urbanovich¹, I.V. Fedoseyeva², G.B. Borovsky²

TRANSFORMATION OF *NICOTIANA TABACUM* BY THE CONSTRUCTION THAT CARRIES *NDB2* GENE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* IN THE ANTISENSE ORIENTATION

¹Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

²Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
Irkutsk, 664033, Russia

Transgenic plants, belonging to T₀ generation with viable seed progeny, were developed by the agrobacterial transformation technique of leaf discs of *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1* tobacco line. A gene of “external” non-phosphorylating NADH-dehydrogenase (*ndb2*) from *Arabidopsis thaliana* was used as a target gene. The gene transfer was performed by the recombinant *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 strain. pBI121_antiNDB2 plasmid, carrying *ndb2* gene in the antisense orientation controlled by constitutive 35S PHK CaMV promoter and nopaline synthase (NOS) terminator as well as selective *nptII* gene controlled by NOS-promoter, was transferred in the T-DNA region of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 strain by the triparental crossing technique. Transcriptional *ndb2* gene activity in the transgenic plants of T₀ generation was shown by the RT-PCR method.

Key words: *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1*, *ndb2* gene, polymerase chain reaction (PCR), polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR), reactive oxygen intermediate (RIO).

Дата поступления статьи 13 января 2017 г.

В.Е. Шимко, И.А. Гордей

ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СОВМЕСТИМОСТИ МУЖСКИ СТЕРИЛЬНЫХ И САМОФЕРТИЛЬНЫХ ЛИНИЙ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ГИБРИДОВ F₁ ОЗИМОЙ РЖИ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: v.shimko@igc.by

Показаны особенности проявления совместимости мужски стерильных (МС) и самофертильных (СФ) линий генетической коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси при формировании гибридов F₁ озимой ржи. Степень проявления совместимости между ними зависит от типа стерильности (Р или G) и генотипической специфичности СФ-линии. Использование в селекционном процессе маркированных МС- и СФ-линий позволило отобрать искомые генотипы для получения гетерозисных гибридов озимой ржи. Показано наличие разных аллелей по признаку «Similar to oryzain alpha chain precursor» (bcd266) у линий МС22, Пл71 и сорта Зарница. Генотипическая специфичность МС-форм G- и Р-типов и трех СФ-линий (Н5,О27, Пл71) позволила выделить лучшие комбинации скрещиваний. Сравнительный анализ гибридов F₁, полученных с использованием МС-линий на основе ЦМС Р- и G-типа и СФ-линий озимой ржи, показал различия гибридных форм по некоторым количественным признакам зерновой продуктивности растений. Наиболее стабильной зерновой продуктивностью характеризовались гибриды F₁, полученные на основе скрещиваний МС-форм Р-, G-типов и СФ-линии Пл71, тем самым определяя их генетическую самосовместимость. Возможно, наличие разных аллелей по признаку «Similar to oryzain alpha chain precursor» у линии Пл71 и МС-линий определяло совместимость родительских форм. Полученные данные позволяют проводить отбор перспективных исследуемых форм для гетерозисной селекции по признакам продуктивности.

Ключевые слова: рожь, мужски стерильные линии, самофертильные линии, совместимость

Введение

Эффективность гибридизации является важнейшим лимитирующим фактором большинства селекционных программ. Установлены молекулярно-генетические, физиологические и морфологические барьеры несовместимости в различных типах внутри- и межвидовых скрещиваний. Известно два типа генетических систем самонесовместимости – гаметофитная и спорофитная. У большинства растений она контролируется одним локусом S, представленным в популяциях серией аллелей одного гена, число которых достигает у ряда видов нескольких сотен (*Leguminosae*, *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Liliaceae* и др.) [1–3]. У овсяницы, ячменя, сахарной свеклы и некоторых других видов обнаружен дигенный гаметофитный контроль самонесовместимости [4]. Семенное воспроизведение популяции ржи возможно лишь при наличии в популяции гетерогенности по аллелям генов несовместимости. Lundgvist предложил двухлокусную модель генетическо-

го контроля самонесовместимости, введя в эту систему аллели Sf и Zf, что позволило ему объяснить природу самонесовместимости [5–9]. Суриков И.М. в своем исследовании показал, что применение 5% уровня фертильности в качестве границы, разделяющей совместимые и несовместимые комбинации, подтверждает выводы Lundgvist о двухлокусной системе контроля несовместимости у ржи [10]. Локусы несовместимости представлены серией аллелей. Суриков рассчитал, что самонесовместимость ржи контролируется не менее чем 16-ю гаметофитными генами. Поскольку самонесовместимость представляет собой сложную физиологическую систему с полигенным контролем, существует множество данных о нарушениях в ее функционировании. В многочисленных исследованиях по инбридингу ржи выявлены автофертильные формы, имеющие мутации в локусах несовместимости [4, 11–13]. Рядом авторов показано, что автофертильность является доминантным признаком [14–18].

Исследования самонесовместимости ведутся как путем постановки анализирующих скрещиваний и самоопыления различных форм с целью проведения генетического анализа, так и путем изучения молекулярно-биологических процессов, лежащих в основе явлений распознавания пыльцы пестиком и контроля роста пыльцевых трубок. Для идентификации локусов несовместимости многие авторы применяли молекулярные маркеры (SSR, STS, RFLP, и др.), которые также были выявлены у других видов растений (пшеница, ячмень, овес, рис, капуста и др.) [19–26]. Voylokov A.V и др. [11] картировали 3 мутации, определяющие самофертильность, в локусах S, Z и S5 самонесовместимости на хромосомах 1R, 2R и 5R в популяции F₂ сорта Volhova и линий ржи, имеющих мутации самофертильности в S-локусе. Отмечено тесное сцепление одного изозимного и 4 RFLP-маркеров. По данным авторов [11], маркерами локуса S (1R) являются *Prx7*, *Xiag249* и *Xpsr634*, локуса Z (2R) – *Xbcd266*, локуса S5 (5R) – *Xpsr100*. Выявлена локализация, связь и частота рекомбинации между S-локусом несовместимости и *Prx7* изозимным локусом (peroxidase 7), Z-локусом несовместимости и локусом β -*Glu* (β -Glucosidase) [11, 27–30]. Егорова И.А., Войлоков А.В. с помощью изозимных маркеров идентифицировали мутации автофертильности (sf-мутации) в трех локусах несовместимости S (1R), Z (2R) и T (5R) у инбредных линий ржи, полученных на основе семи независимых источников автофертильности [22, 23, 31]. Авторы отмечали, что локусы S и Z являются мультиаллельными и определяют специфичность взаимодействия пыльцы и рыльца, T (5R), по-видимому, участвует в осуществлении реакции несовместимости [31]. В настоящее время выявлены гликопротеины (S-РНказы), кодируемые S-локусом самонесовместимости, представленные серией аллелей, связанные с невосприимчивостью собственной пыльцы, установлена рибонуклеазная активность S-РНказ у цветковых растений [22, 23, 32–37]. Установлено, что белки S-РНказы накапливаются в межклеточных пространствах на передающем

тракте столбика. В процессе роста пыльцевых трубок через передающую ткань белок S-РНказы сталкивается с S-РНказой несовместимых пыльцевых трубок, что приводит к деградации РНК пыльцевой трубки [38]. Распознавание специфичности при гаметофитной самонесовместимости может происходить с помощью или белка-рецептора, или определенного ингибитора S-РНказной активности [38–40].

Многие исследователи для проведения генетического анализа используют генетические коллекции автофертильных маркированных линий ржи, а также их гибриды, пшенично-ржаные и ржано-пшеничные хромосомно-замещенные и хромосомно-добавленные линии, трисомики и межвидовые гибриды [18, 41–48]. Для анализа гетерозиготности растений в популяции ржи и выявления спонтанных мутантов Соcнихиной С.П. и др. был разработан метод скрещивания индивидуальных растений из популяций с автофертильными линиями [4]. Такие линии позволяют выявлять гомозиготность по доминантным аллелям генов, что дает проводить селекцию по многим признакам, таким как короткостебельность, устойчивость к болезням, способность к восстановлению фертильности при ЦМС [49–51].

Несмотря на многочисленные исследования самосовместимости ржи, механизмы, лежащие в основе взаимодействия митохондриального генома ржи и ядерных генов, изучены неполно. Недостаточно исследованы генетические процессы межгеномных и ядерно-цитоплазматических взаимодействий при формировании гетерозисных генотипов, характеризующиеся высокой продуктивностью и высоким качеством зерна. Цель нашего исследования – изучение особенностей проявления совместимости мужски стерильных (МС) и самофертильных (СФ) линий при формировании гибридов F₁ озимой ржи.

Материалы и методы

Исходным материалом для исследований служили 9 мужски стерильных (МС) линий озимой диплоидной ржи на основе ЦМС Р (Pampa), G (Guelzower) и 11 линий

из коллекции самофертильной (СФ) диплоидной озимой ржи, полученной на основе генофонда, селективированного в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [18]. В качестве контроля использовали популяционный сорт диплоидной озимой ржи Зарница. Основным методом изучения новых линий и гибридов F_1 являлась парная изоляция и топ-кросс МС-тестеров и самофертильных линий. В полевых условиях растения выращивали мелкоделяночным способом на опытной базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Анализ количественных признаков проводился с помощью стандартных приемов: измерение, взвешивание, визуальная оценка и т.д. Статистическую обработку исследуемого материала проводили по Рокицкому [52]. Выделение тотальной ДНК проведено из листьев 41 образца ЦМС-форм и СФ-линий озимой ржи по методу Draper [53] в нашей модификации. Для каждой линии была взята ДНК отдельных растений. Для исследования Z (2R)-локуса несовместимости использовались STS-маркеры, разработанные В. Haskauf, Р. Wehling [21]. Оптимизированы условия проведения ПЦР с пятью праймерами для Z (2R)-локуса самонесовместимости (табл. 1). По окончании реакции пробы хранили при -20°C . Идентификация ПЦР-фрагментов проводилась методом DGG-электрофореза. В наших исследованиях

разделение продуктов ПЦР осуществляли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле в $1 \times \text{TAE}$ буфере в течение 55 мин при напряжении в 100 В. Результат документировался в системе гель-документации QUANTUM ST4-1100.

Результаты и обсуждение

С целью исследования самосовместимости мужски стерильных и самофертильных линий проведена идентификация Z (2R)-локуса исследуемых образцов. Известно сцепление биохимических и морфологических маркеров 1R-, 2R- и 5R-хромосом ржи с мутациями автофертильности в основных локусах несовместимости [11, 19, 23]. Разработанные Haskauf и Wehling маркеры для Z (2R)-локуса несовместимости связаны с различными биохимическими признаками [21].

В наших исследованиях выявлена гетерогенность изучаемых образцов ржи по анализируемым маркерам (табл. 2): TC32601 обнаружен только у половины исследуемых форм; TC101821 выявлен у всех МС-форм и у половины СФ-линий; TC89057 определялся у всех МС-форм и у 2/3 СФ-линий; TC98482 детектировался у 75% исследуемых форм. Показано наличие всех анализируемых маркеров в популяционном сорте Зарница, который использовался в качестве контроля.

Таблица 1

Условия проведения реакции амплификации используемых праймеров

Праймер	Признак	Последовательность 5'-3'	Размер фрагмента, п.о.	Отжиг праймеров, $^{\circ}\text{C}$	Циклы
TC32601	Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III	F: ACGGACTGGGATTCGGAACAG	750	55	36
		R: AAAGAGAACAAGGTCAACATC			
TC101821	TPR domain, putative	F: AGGGTGATCAGAGACCGGAAG	1700	57	36
		R: AAGCTCAAGGGAAGCAAAATC			
TC89057	Glycerol kinase	F: TGGAGCAAATCCACAGGCCTTC	900	55	36
		R: GCACAAAGTATATGCCACCTG			
TC108778 (=bcd266)	Similar to oryzain alpha chain precursor	F: AAGAGCTTGTTGACTGTGACACTT	1500	55	36
		R: TGCAGATGGGATAGTTATGAGG			
TC98482	AdoHcyase	F: AGACTGACCGCTGGGTCTTC	600	55	35
		R: CCAACCCTCACAAGGCTCA			

Таблица 2

Идентификация Z (2R)-локуса несовместимости исследуемых линий ржи

Исследуемые линии	Маркеры				
	TC32601 750 п.о.	TC101821 1700 п.о.	TC89057 900 п.о.	TC108778 1500/1600 п.о.	TC98482 600 п.о.
MC1	–	+	+	+/	+
MC8	–	+	+	+/	+
MC10	–	+	+	+/	–
MC12	–	+	+	+/	–
MC16	+–	+	+	+/	+
MC22	–	+	+	+/+	–
MC51	+	+	+	+/	+
MC98	–	+	+	+/	+
MC5c	+	+	+	+/	–
H5	+	–	–	+/	+
H14	+	–	+	+/	+
O25	+	–	+	+/	+
O27	–	–	–	+/	–
T40	+	+	+	+/	+
A56	+	+	+	+/	+
Пл71	+	+	+	+/+	+
Па74	+	–	–	+/	+
469/3	–	+	+	+/	+
469/8	–	+	+	+/	+
476/8	–	+	+	+/	+
Сорт Зарница	+	+	+	+/+	+

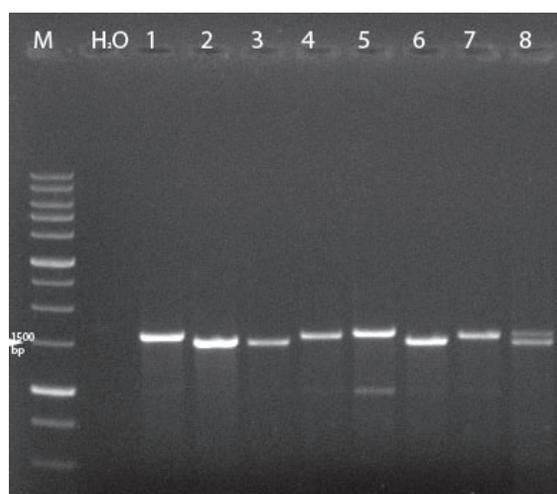


Рис. 1. Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР с маркером TC108778, сцепленным с Z-локусом несовместимости озимой ржи
 М – маркер молекулярного веса Праймтех™, M10 000 bp; 1–8 – СФ-линии озимой ржи

Известно, что *bcd266* сцеплен с Z-локусом несовместимости [11]. При разработке STS-маркеров для ржаного генома В. Наскаuf, Р. Wehling [21] сравнивали точные последовательности 33 генов из определенных областей генома риса. Большая часть отобранных авторами генов локализована в интервале 3-сМ 4-й хромосомы риса. Также использовали три выбранные схожие последовательности с cDNA пробами *bcd266*, *bcd135*, и *Gln2* ячменя.

По данным авторов, разработанный маркер TC108778 (=bcd266) расположен в пределах 3,5 сМ от Z-локуса. В нашем исследовании выявлен полиморфизм маркера TC108778 у исследуемых форм ржи (рис. 1). У отдельных СФ-линий наблюдаемые фрагменты были больше, чем ожидалось, что может указывать на наличие интронов в пределах амплифицированных областей или наличие разных

аллелей [26]. Выявленный полиморфизм анализируемых маркеров подтверждает многоаллельность Z-локуса несовместимости озимой ржи. Возможно наличие разных аллелей по признаку «Similar to oryzain alpha chain precursor» (bcd266) у линий МС22, Пл71 и сорта Зарница может оказывать некоторое влияние на совместимость форм взятых в скрещивания. В результате проведенного анализа Z-локуса

несовместимости с помощью молекулярных маркеров были отобраны МС-формы и СФ-линии (I_5-I_{15}) озимой ржи.

Линии коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси изучены по хозяйственно-полезным признакам (табл. 3). Большинство изучаемых линий были короткостебельные. Наиболее кустистыми оказались МС-линии по сравнению с ЗС- и СФ-линиями.

Таблица 3

Характеристика МС- и СФ-линий озимой ржи по важнейшим количественным признакам

Линии	Высота растений, см	Кустистость	Озерненность колоса, %		Масса, г			
					Зерна с колоса		1000 зерен	
			СО*	СВ**	СО*	СВ**	СО*	СВ**
МС-линии								
1	81	9	49,1	88,3	0,9	1,6	25,1	29,1
8	94	7	28,5	58,4	0,5	1,1	25,5	27,2
10	80	9	67,5	79,1	0,9	1,2	20,3	23,0
12	100	10	51,3	73,8	0,9	1,4	24,4	27,1
16	110	12	83,9	60,4	1,1	0,9	22,3	27,5
22	91	8	21,2	62,1	0,4	1,0	21,1	24,3
51	105	12	51,4	59,2	0,7	0,7	20,2	21,1
98	92	10	25,9	64,7	0,2	0,5	15,5	17,0
5с	100	9	39,1	63,2	0,9	1,6	29,9	34,9
Среднее	94,8 ± 3,4	9,6 ± 0,6	46,4 ± 6,8	67,7 ± 3,5	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	22,7 ± 1,4	25,7 ± 1,7
ЗС-линии								
1	97	10	74,2	63,9	0,9	1,1	21,9	26,1
8	96	9	37,9	53,4	0,8	0,9	26,5	27,0
10	98	12	89,3	85,6	0,9	1,3	17,8	24,2
12	102	10	83,0	80,7	0,9	1,4	21,1	29,2
16	90	10	77,2	85,7	1,1	1,4	18,3	26,5
22	65	5	33,6	28,9	0,3	0,6	24,2	20,9
51	95	5	62,9	63,8	0,5	0,5	12,5	18,5
98	90	8	42,5	49,2	0,4	0,4	13,7	15,1
5с	100	11	19,4	46,6	0,3	1,0	23,4	33,2
Среднее	92,6 ± 3,7	8,9 ± 0,8	57,8 ± 8,3	62,0 ± 6,5	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	19,9 ± 1,6	24,5 ± 1,9
СФ-линии								
Н5	124	10	4,9	58,2	0,1	0,8	17,2	26,1
Н14	147	12	36,9	76,3	0,7	1,1	28,4	22,9
О25	130	7	44,2	78,4	0,5	1,0	21,4	22,2
О27	133	9	40,0	81,8	0,6	1,9	23,7	37,1
Т40	73	14	25,8	60,7	0,2	1,0	13,2	23,4
А56	85	7	36,8	41,6	0,6	0,5	25,4	17,4
Пл71	125	12	36,0	78,7	0,4	1,3	16,7	31,03

Продолжение табл. 3

Линии	Высота растений, см	Кустистость	Озерненность колоса, %		Масса, г			
					Зерна с колоса		1000 зерен	
			СО*	СВ**	СО*	СВ**	СО*	СВ**
Па74	75	7	24,8	69,5	0,4	0,6	21,7	14,8
469/3	98	17	51,6	11,8	0,4	0,1	17,0	14,3
469/8	100	16	67,9	28,7	1,2	0,6	12,1	25,7
476/8	80	7	15,8	44,9	1,2	0,8	17,0	26,2
Среднее	113,5 ± 7,4	9,8 ± 0,7	30,3 ± 3,6	61,9 ± 3,6	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	20,2 ± 1,7	22,4 ± 2,9

* – при самоопылении; ** – при свободном опылении

Показано увеличение озерненности колоса в среднем на 4–40% для большинства исследуемых линий при свободном опылении по сравнению с самоопылением. У СФ-линий озерненность колоса при самоопылении была ниже на 20–30%, чем у МС-форм. Масса зерна с колоса исследуемых форм зависела от генотипа и у большинства линий была выше при свободном опылении. Для СФ-линий выявлено снижение массы зерна с колоса в 2,4 раза при самоопылении по сравнению со свободным опылением. По средним значениям массы 1000 зерен между МС- и СФ-линиями не выявлено достоверных отличий. Для пяти СФ-линий показано снижение массы 1000 зерен в 1,2–4,8 раза при свободном опылении.

Проведена гибридизация МС-форм и СФ-линий коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси. В табл. 4 представлены данные за два года скрещиваний изучаемых линий данной коллекции. В целом отмечено снижение

завязываемости на 8–10% во второй год исследований между СФ-линиями с МС-линиями на основе ЦМС Р- и G-типов, что, вероятно, связано с условиями года выращивания, что согласуется с данными других исследователей о влиянии условий года выращивания на признаки морфоструктуры и зерновой продуктивности [54, 55]. Наиболее стабильной завязываемостью гибридных зерен за два года характеризовались линии Н5, О27, Пл71 с МС-линиями на основе ЦМС G-типа и линия Пл71 с МС-линиями на основе ЦМС Р-типа, что определяет их генетическую совместимость. Достоверных различий по массе 1000 зерен между полученными гибридами на основе Р- и G-типов ЦМС не выявлено. Показано увеличение массы 1000 зерен в 1,4 раза во второй год исследований при скрещивании СФ-линий и МС-линий на основе ЦМС G-типа. Генотипическая специфичность МС-форм G- и Р-типов и 3-х СФ-линий (Н5, О27, Пл71) позволила выделить лучшие комбинации скрещиваний.

Таблица 4

Генетическая совместимость МС-форм и СФ-линий озимой ржи

СФ-линии	МС G-типа				МС Р-типа			
	Завязываемость, %		Масса 1000 зерен, г		Завязываемость, %		Масса 1000 зерен, г	
	2015 г.	2016 г.	2015 г.	2016 г.	2015 г.	2016 г.	2015 г.	2016 г.
Н5	63,9	58,8	21,0	32,5	13,4	3,9	17,3	30,0
Н14	43,3	22,3	19,2	37,1	62,5	14,1	19,7	19,4
О25	32,1	27,2	22,2	30,7	30,8	26,8	19,5	20,8
О27	64,9	53,7	7,7	29,0	5,3	46,9	12,0	20,0
Т40	41,1	28,2	12,1	29,1	7,2	28,7	11,1	21,1
А56	71,2	38,9	24,9	33,9	29,8	19,8	18,7	22,5
Пл71	72,1	79,4	17,6	33,5	46,6	56,4	37,7	38,0
Па74	47,9	37,4	23,9	22,6	10,7	52,2	26,7	24,2

Продолжение табл. 4

СФ- линии	МС G-типа				МС P-типа			
	Завязываемость, %		Масса 1000 зерен, г		Завязываемость, %		Масса 1000 зерен, г	
	2015 г.	2016 г.	2015 г.	2016 г.	2015 г.	2016 г.	2015 г.	2016 г.
469/3	44,5	54,5	14,6	28,8	69,4	17,3	24,1	11,0
469/8	48,8	43,7	28,7	31,4	75,1	30,3	25,0	18,8
476/8	51,2	39,4	27,1	34,3	81,4	36,90	21,0	15,9
Среднее	49,4 ± 4,5	39,4 ± 4,6	22,3 ± 2,6	31,4 ± 0,9	38,5 ± 6,7	30,7 ± 3,9	20,3 ± 1,7	20,9 ± 1,6

Одним из факторов при селекции гибридов F₁ является их способность давать стабильную урожайность в изменяющихся условиях окружающей среды. Сравнительный анализ гибридов F₁, полученных с использованием МС-линий на основе ЦМС P- и G-типа и СФ-линий озимой ржи, позволил выявить различия гибридных форм по некоторым количественным признакам зерновой продуктивности растений (табл. 5). Снижение высоты растений отдельных гибридов F₁ связано с наличием генов доминантной короткостебельности у ро-

дительских СФ-линий (Т40, Па74, 469/3). Отмечено увеличение кустистости на 12% у исследуемых гибридов на основе ЦМС G-типа, что оказывало влияние на общую продуктивность растений. Озерненность колоса у исследуемых гибридов на основе ЦМС G-типа варьировала от 73% до 88% и зависела от материнского генотипа МС-формы. Показано снижение озерненности на 31% у гибридов F₁ на основе ЦМС P-типа, что связано с более сложным контролем P-ЦМС ядерных генов и выраженными нарушениями в митохондриальном геноме [56].

Таблица 5

Характеристика количественных признаков и зерновой продуктивности гибридов F₁ озимой ржи

Комбинации скрещивания		Высота растений, см	Кустистость, ст./раст.	Озерненность колоса, %	Масса		Зерновая продуктивность, г/м ²
МС-формы	СФ-линии				Колоса, г	1000 зерен, г	
ЦМС G-типа	Н5	136	6	83,7	2,3	37,3	768,7
	Н14	148	9	74,4	1,5	30,3	383,0
	О25	142	11	76,1	1,7	30,5	503,0
	О27	140	13	79,5	1,8	33,8	572,3
	Т40	100	10	74,3	1,9	28,6	436,6
	А56	105	8	79,9	1,9	29,5	632,5
	Пл71	128	6	73,6	1,8	37,6	563,3
	Па74	101	9	88,9	2,3	32,3	649,9
	469/3	107	8	81,4	1,9	26,9	514,8
	469/8	145	8	87,7	2,3	29,2	570,9
476/8	142	9	84,	3,1	28,5	567,4	
Среднее		126,7 ± 5,8	8,8 ± 0,6	80,4 ± 1,6	2,0 ± 0,1	31,3 ± 1,1	560,2 ± 35,7
ЦМС P-типа	Н5	140	7	62,3	1,4	33,1	292,3
	Н14	140	6	81,5	1,8	31,6	397,0
	О25	147	9	47,3	1,4	37,2	177,1
	О27	125	5	27,0	0,5	29,2	230,9

Продолжение табл. 5

Комбинации скрещивания		Высота растений, см	Кустистость, ст./раст.	Озерненность колоса, %	Масса		Зерновая продуктивность, г/м ²
МС-формы	СФ-линии				Колоса, г	1000 зерен, г	
ЦМС Р-типа	T40	85	5	58,3	0,9	20,9	310,4
	A56	134	6	47,9	1,2	35,5	414,9
	Пл71	132	7	74,9	2,0	38,7	628,1
	Па74	100	14	71,6	1,6	30,2	278,1
	469/3	105	8	57,2	1,3	33,8	180,6
	469/8	142	8	51,0	1,2	33,2	355,6
	476/8	141	10	29,5	0,8	34,9	396,5
Среднее		126,5 ± 6,1	7,7 ± 0,7	55,3 ± 5,2	1,3 ± 0,1	32,6 ± 1,4	332,6 ± 38,8
Сорт Зарница		128	10	37,9	1,2	47,0	453,7

В наших исследованиях показано, что гибриды F_1 , полученные на основе МС-форм G-типа превышали гибриды на основе ЦМС Р-типа по массе зерна с колоса в среднем в 1,6 раза. Масса 1000 зерен составляла в среднем 31,2 г у гибридов F_1 на основе форм ЦМС G-типа и 32,6 г – у гибридов F_1 на основе ЦМС Р-типа, но не превышала этот показатель у сорта Зарница. Зерновая продуктивность гибридов на основе ЦМС G-типа превышала сорт-контроль у 81% образцов. Показано, что по признакам зерновой продуктивности показатели большинства исследуемых гибридов F_1 на основе ЦМС Р-типа не превышали сорт Зарница. Наиболее стабильной зерновой продуктивностью характеризовались гибриды F_1 , полученные на основе скрещиваний МС-форм Р-, G-типов и СФ-линии Пл71, тем самым определяя их генетическую самосовместимость. Возможно, наличие разных аллелей по признаку «Similar to oryzain alpha chain precursor» (bcd266) у линии Пл71 и МС-линий определяло совместимость родительских форм.

Заключение

В наших исследованиях показаны особенности проявления совместимости мужски стерильных (МС) и самофертильных (СФ) линий генетической коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси при формировании гибридов F_1 озимой ржи. Степень проявления совместимости между ни-

ми зависит от типа стерильности (Р или G) и генотипической специфичности СФ-линии. Использование в селекционном процессе маркированных МС- и СФ-линий позволило отобрать искомые генотипы для получения гетерозисных гибридов озимой ржи. Показано наличие разных аллелей по признаку «Similar to oryzain alpha chain precursor» (bcd266) у линий МС22, Пл71 и сорта Зарница. Генотипическая специфичность МС-форм G- и Р-типов и 3-х СФ-линий (Н5, О27, Пл71) позволила выделить лучшие комбинации скрещиваний. Сравнительный анализ гибридов F_1 , полученных с использованием МС-линий на основе ЦМС Р- и G-типа и СФ-линий озимой ржи, показал различия гибридных форм по некоторым количественным признакам зерновой продуктивности растений. Наиболее стабильной зерновой продуктивностью характеризовались гибриды F_1 , полученные на основе скрещиваний МС-форм Р-, G-типов и СФ-линии Пл71, тем самым определяя их генетическую самосовместимость. Возможно, наличие разных аллелей по признаку «Similar to oryzain alpha chain precursor» у линии Пл71 и МС-линий определяло совместимость родительских форм. Полученные данные позволяют проводить отбор перспективных исследуемых форм по признакам продуктивности для гетерозисной селекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (договор №Б15-066).

Список использованных источников

- Inbreeding depression in *Solanum carolinense* (Solanaceae), a species with a plastic self-incompatibility response / J.I. Mena-Ali [et al.] // BMC Evolutionary Biology. – 2008. – Vol. 8. – P. 1–10.
- Takayama, S. Self-Incompatibility in Plants / S. Takayama, A. Isogai // Annu. Rev. Plant Biol. – 2005. – Vol. 56. – P. 467–489.
- Molecular Evolution within and between Self-Incompatibility Specificities / V. Castric [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2010. – Vol. 27, № 1. – P. 11–20.
- Смирнов, В.Г. Генетика ржи / В.Г. Смирнов, С.П. Соснихина – Ленинград: ЛГУ им. А.А. Жданова. – 1984. – 264 с.
- Lundgvist, A. Self-incompatibility in rye. 1. Genetic control in the ditloid / A. Lundgvist // Hereditas. – 1956. – Vol. 42. – P. 293–348.
- Lundgvist, A. Self-incompatibility in rye (*Secale cereale* L.) / Rec. Adv. Bot. – 1961. – sect. 13. – P. 1495–1499.
- Lundgvist, A. Self-incompatibility in rye. IV. Factors related to self-seeding / A. Lundgvist // Hereditas. – 1958. – Vol. 44. – P. 193–256.
- Lundgvist, A. The origin of self-incompatibility in rye // Hereditas. – 1960. – Vol. 46. – P. 1–19.
- Lundgvist, A. The nature of the two-loci incompatibility system in grasses. I. The hypothesis of a duplicative origin / A. Lundgvist // Hereditas. – 1962. – Vol. 48. – P. 153–168.
- Суриков, И.М. Теория самонесовместимости в связи с генетикой самофертильности ржи: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03-103 / И.М. Суриков. – Ленинград, 1972. – 53 с.
- Voylokov, A.V. Mapping of three self-fertility mutations in rye (*Secale cereale* L.) using RFLP, isozyme and morphological markers / A.V. Voylokov, V. Korzun, A. Boerner // Theor. Appl. Genet. – 1997. – Vol. 97. – P. 147–153.
- Trang, Q.S. Number of Alleles at the Incompatibility Loci in *Secale cereale* L. / Q.S. Trang, G. Wricke, W.E. Weber // Theor. Appl. Genet. – 1982. – Vol. 63. – P. 245–248.
- Voylokov, A.V. Genetic studies of self-fertility in rye (*Secale cereale* L.). 1. The identification of genotypes of self-fertile lines for the Sf alleles of self-incompatibility genes / A.V. Voylokov, F.T. Fuong, V.G. Smirnov // Theor. Appl. Genet. – 1993. – Vol. 87, № 5. – P. 616–618.
- Краснюк, А.А. Узкородственное разведение у ржи / А.А. Краснюк – М. – 1936. – 52 с.
- Федоров, В.С. Автофертильность диплоидной и тетраплоидной ржи / В.С. Федоров, В.Г. Смирнов, С.П. Соснихина // Цитология и генетика. – 1971. – Т. 5, № 1. – С. 3–9.
- Федоров, В.С. Некоторые итоги исследований по частной генетике ржи. / В.С. Федоров, В.Г. Смирнов, С.П. Соснихина // в кн.: Исследования по генетике. – Вып. 4. – 1971. – С. 117–133.
- Федоров, В.С. Получение и изучение автофертильных линий у ржи *Secale cereale* L. / В.С. Федоров, В.Г. Смирнов, С.П. Соснихина // Использование насыщающих скрещиваний и самонесовместимости в селекции сельскохозяйственных растений. – Киев. – 1975. – С. 132–139.
- Кедраў-Зіхман, А.А. Новая крыніца самафертыльнасці жыта / А.А. Кедраў-Зіхман, Т.И. Шарепа, Л.Н. Панятоўская // Весці АН БССР, сер. біял. навук. – 1986. – № 3. – С. 115–116.
- Картирование генома ржи (*Secale cereale* L.) с помощью молекулярных маркеров / С.В. Малышев [и др.] // Вестник ВОГиС. – 2005. – Т. 9, № 4. – С. 473–480.
- Wehling, P. Identification of S-locus linked PCR fragments in rye (*Secale cereale* L.) by denaturing gradient gel electrophoresis / P. Wehling, B. Hackauf, G. Wricke // The Plant. Journal. – 1994. – Vol. 5(6). – P. 891–893.
- Hackauf, B. Approaching the self-incompatibility locus Z in rye (*Secale cereale* L.) via comparative genetics / B. Hackauf, P. Wehling // Theor. Appl. Genet. – 2005. – Vol. 110. – P. 832–845.
- Studer, B. Z locus self-incompatibility alleles in Poaceae [Электронный ресурс] / Bruno Studer, Torben ASP. – Режим доступа: <http://www.google.com/patents/WO2014029861A1>. – 2014.
- Войлоков А.В. Генетическое картирование у ржи *Secale cereale* L.: автореферат дис. ... докт. биол. наук: 03-103 / А.В. Войлоков. – СПб, 2008. – 30 с.
- Schlegel1, R. Genes, marker and linkage data of rye (*Secale cereale* L.): 5th updated inventory / R. Schlegel1, G. Melz1, V. Korzun // Euphytica. – 1998. – Vol. 101. – P. 23–67.

25. Saal, B. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.) / B. Saal, G. Wricke // *Genome*. – 1999. – Vol. 42. – P. 964–972.
26. Hackauf, B. Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome / B. Hackauf, P. Wehling // *Plant Breeding*. – 2002. – Vol. 121. – P. 17–25.
27. Wricke, G. Linkage between an incompatibility locus and a peroxidase isozyme locus (Prx7) in rye / G. Wricke, P. Wehling // *Theor. Appl. Genet.* – 1985. – Vol. 71. – P. 289–291.
28. Wehling, P. Chromosomal location of esterase, peroxidase and phosphoglucomutase isozyme structural genes in cultivated rye (*Secale cereale* L.) / P. Wehling, G. Schmidt-Stohn, G. Wricke // *Theor. Appl. Genet.* – 1985. – Vol. 70. – P. 377–382.
29. Fuong, F.T. Genetic studies of self-fertility in rye (*Secale cereale* L.). 2. The search for isozyme marker genes linked to self-incompatibility loci / F.T. Fuong, A.V. Voylovkov, V.G. Smirnov // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – Vol. 87, № 5. – P. 619–623.
30. Philipp, U. A linkage map of rye / U. Philipp, P. Wehling, G. Wricke // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – Vol. 88. – P. 243–248.
31. Егорова, И.А. Характеристика инбредных линий ржи по мутациям автофертильности в основных локусах несовместимости / И.А. Егорова, А.В. Войлоков // *Генетика*. – 1998. – Т. 34, № 11. – С. 1493–1499.
32. Analysis of the S-locus structure in *Prunus armeniaca* L. Identification of S-haplotype specific S-RNase and F-box genes / C. Romero [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 56. – P. 145–157.
33. Lopes de Albuquerque Jr., C. The self-incompatible RNase S-alleles of Brazilian apple cultivars / C. Lopes de Albuquerque Jr., F. Denard, A.C. de Mesquita Dantas, R.O. Nodari // *Euphytica*. – 2011. – Vol. 181. – P. 277–284.
34. Liu, Z. *Pyrus pyrifolia* stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes *in vitro* / Z. Liu, G. Xu, S. Zhang // *Protoplasma*. – 2007. – Vol. 232. – P. 61–67.
35. Structural Analysis and Molecular Model of a Self-Incompatibility RNase from Wild Tomato / S. Parry [et al.] // *Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 116. – P. 463–469.
36. Collaborative Non-Self Recognition System in S-RNase-Based Self-Incompatibility / K. Kubo [et al.] // *Science*. – 2010. – Vol. 330. – P. 796–799.
37. Matsumoto S. Apple Pollination Biology for Stable and Novel Fruit Production: Search System for Apple Cultivar Combination Showing Incompatibility, Semicompatibility, and Full-Compatibility Based on the S-RNase Allele Database / S. Matsumoto // *International Journal of Agronomy*. – 2014. – Vol. 4. – P. 1–9.
38. Sims, T.L. Molecular genetics gametophytic self-incompatibility in *Petunia hybrida* / T.L. Sims, R.G. Fjellstrom, P.D. Collins // *Plant Physiol.* – 1997. – Vol. 114, № 3. – P. 240–248.
39. Harbord, R.M. Segregation distortion of T-DNA markers linked to the self-incompatibility (S) locus in *Petunia hybrida* / R.M. Harbord, C.A. Napoli, T.P. Robbins // *Genetics*. – 2000. – Vol. 154, N 3. – P. 1323–1333.
40. Влияние ионов кальция на рост пыльцевых трубок ржи (*Secale cereale* L.) / А.Ю. Калинина [и др.] // *Вестн. С.-Петербург. ун-та*. – 1999. – Сер. 3, № 3. – С. 31–35.
41. Fedac, G. A viable hybrid between *Hordeum vulgare* and *Secale cereale* / G. Fedac // *Cereal Research Communications*. Szeged. – 1978. – Vol. 6, N 4. – P. 353–358.
42. Орлова, И.Н. Скрещиваемость озимой пшеницы-однозернянки с рожью и мейоз у гибридов F₁ / И.Н. Орлова, Л.В. Прилюк // *Цитология и генетика*. – 1993. – Т. 27, № 1. – С. 42–45.
43. Новый тип аномалий мейоза – перегородки в синаптонемальных комплексах у растений инбредной линии Ms6 ржи *Secale cereale* L. / Ю.Ф. Богданов [и др.] // *Генетика*. – 1997. – Т. 33, № 9. – С. 1236–1243.
44. Petersen, G. Meiosis of intergeneric hybrids between polyploid species of *Hordeum* and *secale* / G. Petersen // *Hereditas*. – 1992. – Vol. 116, № 1/2. – P. 101–105.
45. Baum M. Rye – wheat hybrids: the production of wheat chromosome additions to rye / M. Baum // *Genome*. – 1991. – Vol. 34, № 5. – P. 840–844.
46. Melz, G. Spontaneous somatic transfer of a segment from a wheat addition chromosome into the rye genome / G. Melz, V. Thiele // *Genome*. – 1990. – Vol. 33. – P. 794–797.

47. Tarkowski, C. The use of chromosome substitutions and translocations in the breeding of triticale, wheat and rye / C. Tarkowski, B. Apolinarska // *Hereditas*. – 1992. – Vol. 116. – P. 281–283.
48. New genetic map of rye composed of PCR-based molecular markers and its alignment with the reference map of the DS2 x RXL10 intercross / P. Molczarski [et al.] // *J. Appl. Genet.* – 2007. – Vol. 48, N 1. – P. 11–24.
49. Генетическая коллекция озимой ржи и возможности ее использования в исследованиях по генетике и в селекционных программах / В.Г. Смирнов [и др.] // *Изогенные линии и генетические коллекции. Второе совещание: сб. статей, Новосибирск.* – 1993. – С. 127–129.
50. Коваль, С.Ф. Некоторые проблемы работы с генетическими коллекциями / С.Ф. Коваль // *Изогенные линии и генетические коллекции. Второе совещание: сб. статей, Новосибирск.* – 1993. – С. 6–9.
51. Штурм, В. Локализация рецессивного гена короткостебельности мутанта московский карлик у *Secale cereale* L. / В. Штурм, Х.В. Мюллер // *Цитология и генетика.* – 1982. – № 3. – С. 13–16.
52. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий // *Минск: Вышэйшая школа, 1973.* – 327 с.
53. The design and performance of an experimental external fixator with variable axial stiffness and a compressive force transducer / E.R.C. Draper [et al.] // *Med Eng Phys.* – 1997. – Vol. 19. – P. 690–695.
54. Гетерозис в селекции сельскохозяйственных растений / А.В. Кильчевский [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр.* – 2008. – Т. 8 – С. 7–24.
55. Теоретические основы селекции зерновых культур на продуктивность / Л.В. Хотылева [и др.]; под общ. ред. Д.Ф. Санько. – *Минск: Наука и техника, 1987.* – 279 с.
56. Stojalowski, S. Identificatin of sterility-inducing cytoplasms in rye using the plasmatypogenotype interaction test and newly developed SCAR markers / S. Stojalowski, M. Lapinski, M. Szklarczyk // *Theor. Appl. Genet.* – 2006. – Vol. 112. – P. 627–633.

V.E. Shymko, I.A. Gordei

PECULIARITIES OF GENETIC COMPATIBILITY IN MALE-STERILE AND SELF-FERTILE LINES IN F₁ HYBRIDS' FORMATION OF WINTER RYE

Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus
Minsk BY-220072, the Republic of Belarus

The demonstration of compatibility in male sterile (MS) and self-fertile (SF) lines of the genetic collection of the Institute of Genetics and Cytology at the National Academy of Sciences of Belarus was shown in F₁ hybrids' formation of winter rye. The degree of compatibility demonstration between them depends on the sterility type (P or G) and SF-line genotype specificity. Use of marked MC- and SF-lines in the breeding process made it possible to select the desired genotypes for heterotic hybrids F₁ of winter rye. The presence of different alleles based on the "Similar to oryzain alpha chain precursor" (bcd266) character in MC22 and P171 lines and in "Zarnitsa" variety was shown. The genotypic specificity of G- and P-types of MS-forms and 3 SF-lines (H5, O27, and P171) made it possible to identify the best crossing combination. The comparative analysis of F₁ hybrids developed using MS- lines of CMS P- and G-types and SF-lines of winter rye showed the differences in some forms of quantitative traits of the grain productivity. F₁ hybrids are characterized by the most stable grain productivity; they were derived from P- and G-types of MS-forms and P171 SF-line crossings, and thus, determining their genetic self-compatibility. It is possible that the presence of different alleles on the basis of the "Similar to oryzain alpha chain precursor" character in P171 line and MS-lines determined the compatibility of parental forms. The obtained data allows to perform the selection of perspective forms of study on productivity grounds for heterotic breeding.

Key words: rye, male sterile lines, self-fertile lines, compatibility

Дата поступления статьи 5 января 2017 г.

С.М. Сичкарь, Л.Г. Великожон, О.В. Дубровная

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ХЛЕБОПЕКАРНЫЕ КАЧЕСТВА ГИБРИДОВ *TRITICUM SPELTA* L. × *TRITICUM AESTIVUM* L.

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022, Украина, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17
e-mail: sichkar07@gmail.com

Проанализировано аллельное состояние генов локусов Glu-A1 и Glu-D1 у родительских компонентов – образцов озимой спельты и сортов мягкой пшеницы и их межвидовых гибридов. Выделены образцы спельты и гибридные комбинации, которые могут быть перспективными для дальнейшей селекционной работы. Показано, что наличие аллеля *d* локуса Glu-D1 повышает хлебопекарные свойства гибридов. Генетическое улучшение спельты путем межвидовой гибридизации с сортами мягкой пшеницы, которые содержат только аллель *d* локуса Glu-D1, может способствовать созданию линий с повышенным содержанием белка и хорошими хлебопекарными качествами.

Ключевые слова: *Triticum spelta* L., *T. aestivum* L., ПЦР-анализ, хлебопекарные качества.

Введение

Пшеница спельта (*Triticum spelta* L.) – вид пленчатой пшеницы, геном которой (AⁿAⁿBBDD), близкородственный гексаплоидной мягкой пшенице (*T. aestivum* L.), имеет формы ярового и озимого типа развития. Повышенное внимание к спельте во многих странах Европы в последнее десятилетие обусловлено рядом причин, среди которых можно назвать пригодность для низкозатратного, органического земледелия, а также некоторые пищевые и технологические свойства, позволяющие ей в ряде случаев потеснить традиционно доминирующую мягкую пшеницу [1–3]. По данным ряда авторов установлено, что клейковина спельты лишена или, по крайней мере, имеет меньше, чем клейковина мягкой пшеницы, компонентов, вызывающих целиакию (мультифакториальное заболевание, характеризующееся непереносимостью злаковых культур) у восприимчивых людей [1–3]. По сравнению с твердозерной мягкой пшеницей спельта характеризуется низким содержанием нерастворимых полимерных белков, но высоким содержанием глиадинов и растворимых полимерных белков, благодаря чему имеет мягкую и менее эластичную (упругую) клейковину. Сорта спельты также отличаются по содержанию отдельных незаменимых аминокислот: аргинина, аспарагиновой кислоты,

валина, лейцина, тирозина, содержат ряд микро- и макроэлементов, ненасыщенных жирных кислот и других полезных веществ [4]. Кроме того, мука из зерна спельты обладает уникальными вкусовыми качествами и высоким содержанием витаминов группы В [5], а также пригодна для изготовления лучших по качеству кондитерских изделий [1–3].

Наряду с этим, спельта имеет ряд негативных качеств, главными из которых являются тяжелый обмолот зерна вследствие плотного охвата его крепкими чешуйками – «пленчатость», ломкость колоса, низкая производительность [6]. В целом, по урожайности и пригодности к современным технологиям выращивания и переработки спельта не может сейчас конкурировать с сортами мягкой и твердой пшеницы, созданными научной селекцией. Вместе с тем, именно путем генетического улучшения и селекции можно устранить недостатки спельты и при этом сохранить ее ценные свойства. Главным методом улучшения спельты считается межвидовая гибридизация с мягкой пшеницей.

Известно, что хлебопекарные качества сортов пшеницы определяются физическими свойствами клейковинного комплекса зерна, который образуют белки глиадины и глютенины. Эти белки принадлежат к классу запасных (по их биологической функции у растений)

или клейковинных (по их технологическому использованию) [7]. Среди них важное место по эффективности занимают QTL и генные структуры, определяющие состав высокомолекулярных субъединиц глютеинов (HMW-GS). Локусы высокомолекулярных субъединиц глютеинов Glu-A1, Glu-B1 и Glu-D1 размещены на длинных плечах хромосом 1AL, 1BL и 1DL мягкой пшеницы. Они кодируют высокомолекулярные полипептиды, которые за счет межмолекулярных дисульфидных связей формируют основной каркас клейковины и характеризуются меньшим, чем глиадины, полиморфизмом [8].

Полиморфизм запасных белков используется для изучения генетического разнообразия спельты [9–11]. Среди аллелей глиадинов и высокомолекулярных субъединиц глютеинов у спельты обнаружены как идентичные аллелям мягкой пшеницы, так и новые, выявленные только у спельты [12]. Вместе с тем, на сегодня разработаны молекулярные методы с использованием ПЦР для изучения генетического полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов, контролирующих качественные показатели зерна пшеницы. ДНК-маркеры разработаны к последовательностям генов высокомолекулярных глютеинов для улучшения селекции с помощью маркеров (MAS) и раннего отбора генотипов с хорошими хлебопекарными качествами [13–15]. В частности, разработаны кодоминантные маркеры, пригодные для анализа субъединиц высокомолекулярных глютеинов, которые кодируются локусами Glu-A1 и Glu-D1 [16]. В связи с этим, целью нашей работы было определение аллельного состояния генов локусов Glu-A1 и Glu-D1 у родительских компонентов – образцов озимой спельты и сортов мягкой пшеницы и их межвидовых гибридов, а также сравнительный анализ наличия отдельных локусов и проявлений признаков качества зерна.

Материалы и методы

Материалом исследования были образцы спельты (УК 2С/15–УК 11С/15) из коллекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины, а также простые и беккросные гибриды первого и второго поколений, полученные при их скрещивании с сортами мягкой пшеницы Наталка и Зимоярка.

Для проведения мультиплексной полимеразной реакции с целью выявления аллельного состояния генов Glu-A1, отвечающих за синтез белковых субъединиц Ax1, Ax2 * Ax-null, использовали праймеры UMN19F (5'-CGAGACAATATGAGCAGCAAG-3') и UMN19R (5'-CTGCCATGGAGAAGTTGGA-3') к целевому гену и праймеры к референтному гену пшеницы *actin*. Режим амплификации: денатурация – 94 °С 3 мин и 34 цикла: денатурация – 94 °С 30 с, отжиг – 60 °С 30 с, элонгация – 72 °С 30 с, конечная элонгация – 72 °С 5 мин. Продукты ПЦР разделяли в 2%-ном агарозном геле с бромистым этидием в 1xSB-электродном буфере. Размер ожидаемых ампликонов составил: для аллеля Ax2 * (аллель *b*, ампликон 344 п.н.), для аллелей Ax1 или Ax-null (аллели *a* или *c*, ампликон 362 п.н.). Ампликон размером 507 п.н. детектирует наличие референтного гена пшеницы *actin* и указывает на адекватность проведения полимеразной реакции.

Выявление аллелей локусов Glu-D1 базируется на проведении дуплексной полимеразной реакции (одновременное выявление аллелей генов), кодирующих субъединицы Dx5 и Dy10 (5 + 10) и Dx2 и Dy12 (2 + 12) в сортах и селекционных гибридах мягкой пшеницы с использованием специфических праймеров UMN25F: (5'-GGGACAATACGAGCAGCAAA-3') – для Dx2; UMN25R: (5'-GTTCCGGTTGTTGCA-3') – для Dx5; UMN26F: (5'-CGCAAGACAATATGAGCAAAC-3') – для Dy10; UMN26R: (5'-TTGCSTTTGTC-CTGTGTGC-3') – для Dy12. Для образцов с субъединицами 5 + 10 наблюдали наличие ампликонов 397 и 281 п.н., с субъединицами 2 + 12 – ампликонов 415 и 299 п.н. Режим амплификации: денатурация – 94 °С 3 мин и 34 цикла: денатурация – 94 °С 30 с, отжиг – 60 °С 30 с, элонгация – 72 °С 1 мин, конечная элонгация – 72 °С 5 мин. Продукты амплификации визуализировали после их электрофоретического разделения в 2,5%-ном агарозном геле в ультрафиолетовом свете с привлечением этидия бромида как красящего реагента.

Содержание белка и клейковины зерна исследуемых образцов определяли в шроте, полученном на мельнице Perten 3100. Другие лабораторные анализы выполнялись с использованием муки 70%-ного выхода, которую по-

лучали из зерна на мельнице CD-1. Показатели содержания белка и клейковины определяли на приборе Inframatic 8600. Измерения осуществлялись при температуре окружающей среды 25 °С. Для анализа использовали навески шрота массой 50 г.

Для определения физических свойств пшеничного теста использовали прибор Альвео-консистограф фирмы Chopin. Измерение происходит благодаря сопротивлению блинчика теста нагнетательному воздуху при растяжении его в пузырь до разрыва. По данным альвеограммы получают значение растяжимости (L) и упругости (P) теста, силы муки (W) и отношение упругости теста к его растяжимости (P/L). Последний показатель (P/L) характеризует меру сбалансированности между собой этих основных физических свойств.

Лабораторную выпечку хлеба из пшеничной муки проводили безопарным методом. Для замеса теста использовали 100 г пшеничной муки 70%-ного выхода (при влажности 14%), прессованные хлебопекарные дрожжи, соль (экстра), сахар, бромат калия, аскорбиновую кислоту, водопроводную воду по расчету в со-

ответствии с ВПС муки по фаринографу при консистенции теста 500 е.ф. Выпекали хлеб в течение 25 мин при температуре 230 °С. Общая продолжительность процесса от начала замеса теста до конца выпечки составила 3,5–4,5 ч.

Результаты и обсуждение

Электрофоретическое определение продуктов амплификации ДНК показало, что у проанализированных коллекционных образцов спельты были выявлены аллели *a* или *c* в локусе *Glu-A1* и отсутствие аллеля *b*, однако были выделены генотипы, которые различались по наличию аллелей *a* и *d* в локусе *Glu-D1*. Такие контрастные формы были нами использованы для проведения гибридизации (табл. 1).

При анализе родительских компонентов и межвидовых гибридов на наличие аллелей локуса *Glu-A1*, результаты которого представлены на рис. 1, выявлено, что у всех образцов были определены аллели *a* или *c* в геноме *A*, о чем свидетельствует наличие ампликона длиной 362 п.н.

Таблица 1

Наличие аллелей локусов *Glu-1*, кодирующих синтез высокомолекулярных глютелинов у родительских компонентов гибридов

№ п/п	Родительские компоненты	<i>Glu-A1</i>		<i>Glu-D1</i>	
		<i>a/c</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>d</i>
1	УК 2С/15	+	–	+	–
2	УК 3С/15	+	–	+	–
3	УК 4С/15	+	–	+	–
4	УК 5С/15	+	–	+	+
5	УК 7С/15	+	–	+	+
6	УК 8С/15	+	–	+	–
7	УК 9С/15	+	–	+	+
8	УК 10С/15	+	–	–	+
9	УК 11С/15	+	–	+	+
10	Наталка	+	–	–	+
11	Зимоярка	+	–	+	–

Гибрид (УК 10С/15 × Наталка) характеризуется отсутствием аллеля *a* локуса *Glu-D1* (рис. 2), как и его родительские компоненты.

Нами проведен анализ ДНК простых гибридных комбинаций *T. spelta* L. × *T. aestivum* L.,

родительские компоненты которых различаются наличием или отсутствием аллелей *a* и *d* локуса *Glu-D1*. Как и ожидалось, у проанализированных форм обнаружены как аллели отцовского компонента, так и материнского,

что подтвердило гибридность полученных растений. Следует отметить, что в случае, когда родительские компоненты имели разные аллели, то они выявлялись у гибрида с одинаковой интенсивностью (рис. 3, дорожки 9–12),

в то время как при наличии и у отцовского, и у материнского компонента одинаковых аллелей интенсивность окраски фрагментов увеличивалась, что может свидетельствовать о многокopianности (рис. 3, дорожки 7, 8, 13, 14).

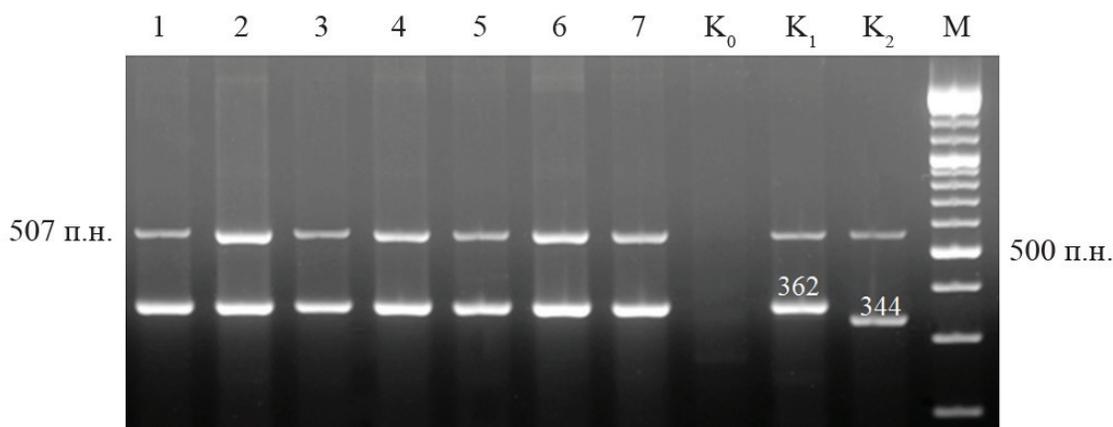


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК родительских форм и гибридов *T. spelta* L. × *T. aestivum* L. с праймерами к аллелям локуса Glu-A1 и референтного гена *actin*. Дорожки: 1 – УК 2С/15; 2 – УК 5С/15; 3 – УК 10С/15; 4 – Наталка; 5 – (УК 2С/15 × Наталка); 6 – (УК 5С/15 × Зимоярка); 7 – (УК 10С/15 × Наталка); K_0 – отрицательный контроль без добавления ДНК (ТЕ буфер); K_1 – положительный контроль (пшеница, содержит аллель Glu-A1 *a/c*); K_2 – положительный контроль (пшеница, содержит аллель Glu-A1b); М – маркер молекулярной массы ДНК Ladder Mix

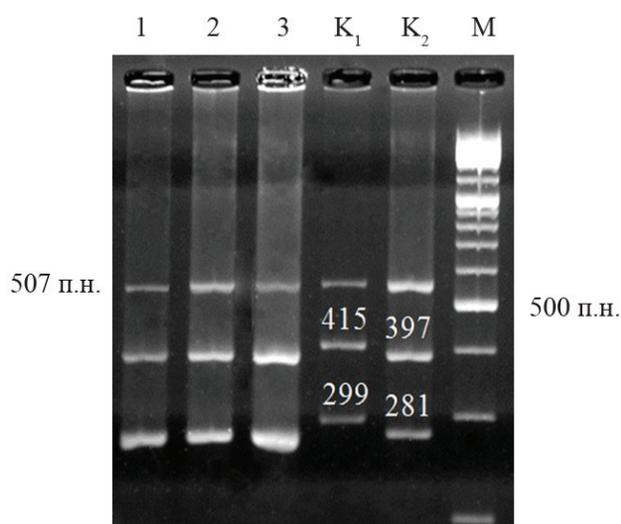


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК родительских форм и гибрида *T. spelta* L. × *T. aestivum* L. с праймерами к аллелю локуса Glu-D1. Дорожки: 1 – (УК 10С/15 × Наталка) 2 – УК 10С/15; 3 – Наталка; K_1 – контроль (пшеница, содержит аллель Glu-D1 *a*); K_2 – контроль (пшеница, содержит аллель Glu-D1 *d*); М – маркер молекулярной массы ДНК Ladder Mix

Известно, что сильное влияние на качество муки пшеницы оказывают аллели локуса Glu-D1. Следующими по влиянию являются аллели локусов Glu-B1 и Glu-A1 [17]. Аллельные варианты высокомолекулярных глютеинов 1A1, 1A2* 1В 7 + 8, 1В 77 + 8, 1D 5 + 10 определяют высокие показатели качества зерна и хлебопекарных свойств пшеницы [18]. Доказано существование тесной корреляционной зависимости между присутствием/отсутствием определенных аллелей локусов Glu-1 и показателями хлебопекарного качества. Установлено, что аллель *d* локуса Glu-D1 (при наличии которого синтезируются субъединицы 5 и 10) с индексом качества 4 имеет выраженное положительное влияние на качество муки. С другой стороны, распространенный аллель *a* (субъединицы 2 и 12) оказывает негативное влияние на получение качественного формового хлеба, однако рекомендуется для сортов, которые используются для изготовления подового хлеба, лапши и кондитерских изделий.

При анализе образца спельты УК 10С/15 (табл. 2) было обнаружено, что наличие аллеля *d* локуса Glu-D1 приводит к снижению

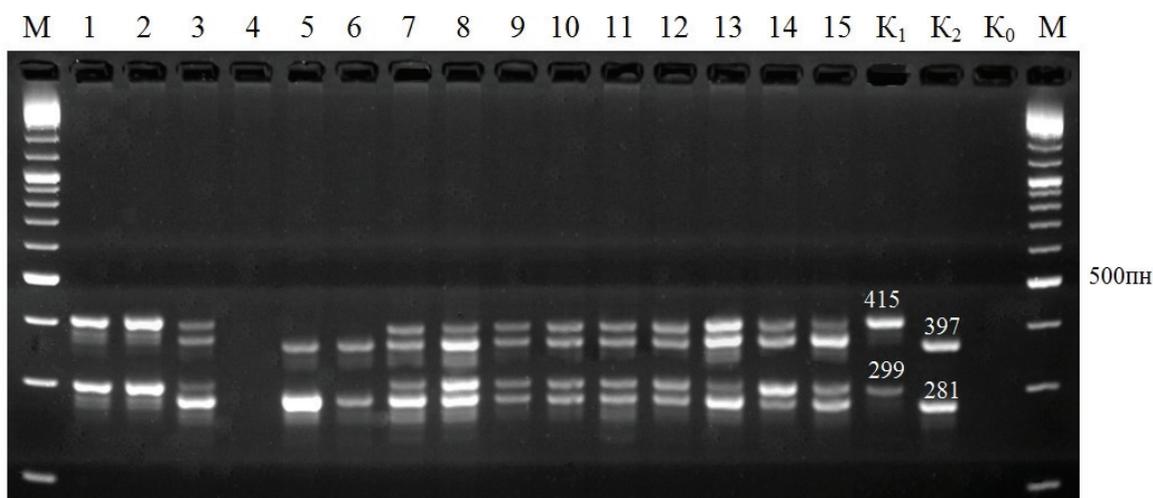


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК родительских форм и гибридов *T. spelta* L. × *T. aestivum* L. с праймерами к аллелям локуса Glu-D1. Дорожки: 1 – Зимоярка; 2 – УК 2С/15; 3 – УК 5С/15; 4 – Полба (отсутствие генома D); 5 – УК 10С/15; 6 – Наталка; 7 – (УК 7С/15 × Наталка); 8 – (УК 5С/15 × Наталка); 9 – (УК 3С/15 × Наталка); 10 – (УК 4С/15 × Наталка); 11 – (УК 2С/15 × Наталка); 12 – (УК 8С/15 × Наталка); 13 – (УК 9С/15 × Наталка); 14 – (УК 11С/15 × Наталка); 15 – (УК 10С/15 × Зимоярка); K₀ – отрицательный контроль без добавления ДНК (ТЕ буфер); K₁ – положительный контроль (пшеница, содержит аллель Glu-D1 *a*); K₂ – положительный контроль (пшеница, содержит аллель Glu-D1 *d*); M – маркер молекулярной массы ДНК Ladder Mi

белка, однако повышается показатель седиментации, который был выше, чем у образцов УК 2С/15 и УК 5С/15, которые имели аллели *a* и *a + d* соответственно. В то же время образец спельты УК 2С/15 с алелем *a* имеет большее содержание белка по сравнению с носителями аллелей *d* и *a + d*.

Анализируя гибридные комбинации *Triticum spelta* L. × *T. aestivum* L., родительские компоненты которых различаются наличием или отсутствием аллелей *a* и *d* локуса Glu-D1 бы-

ло обнаружено, что у гибрида (УК 10С/15 × Наталка), родительские компоненты которого характеризуются наличием только аллеля *d*, хлебопекарные свойства превосходили гибрид (УК 2С/15 × Наталка) (табл. 3), у которого имелись *a* и *d* аллели локуса Glu-D1 (рис. 4). Это подтверждает, что аллель *d* имеет большее влияние на хлебопекарные свойства муки, однако данный гибрид требует более детального изучения, ведь не установлено, какой именно аллель присутствовал в локусе Glu-A1.

Таблица 2

Результаты биохимического анализа зерна образцов спельты и гибридов

Образцы спельты и гибриды	Белок, %	Клейковина, %	Твердозерность	SDS-30
УК 2С/15	17,4	37,5	16	13
УК 5С/15	16,7	35,9	8	13
УК 10С/15	15,6	33,4	8	32
Наталка	14,1	30,0	37	93
(УК 10С/15 × Наталка)	16,2	34,7	13	76
(УК 2С/15 × Наталка)	16,7	35,9	12	38
((Наталка × УК 2С/15) × Наталка)	16,4	35,3	10	87
(УК 2С/15 × (Наталка × УК 2С/15))	17,6	38,0	11	28

У беккросного гибрида ((Наталка × УК 2С/15) × Наталка) был наибольший показатель седиментации (табл. 2) и лучшие хлебопекарные свойства (табл. 3) (рис. 5), однако содержание белка снижалось. У беккросного гибрида (УК 2С/15 × (Наталка × УК 2С/15)) наблюдалась противоположная тенденция.

Главными показателями качества теста являются соотношение упругости к эластичности теста, «индекс эластичности теста» и сила

муки. Считается, если «индекс эластичности теста» выше 60%, то образцы муки лучшего качества, ниже – среднего и удовлетворительного качества. У гибридов этот показатель составлял от 47,3% до 63,9%.

У образцов спельты индекс эластичности был значительно ниже (в пределах 30,7–35,3%), чем у простых межвидовых гибридов, где он превышал 60%. У беккросных гибридов он снижался до 47–54%.

Таблица 3

Хлебопекарные качества родительских форм и гибридов

Образцы спельты и гибриды	Упругость теста	P/L	Сила муки, а.о.	СПО муки, %	Индекс эластичности	Объем хлеба из 100 г муки	Общая хлебопекарная оценка
УК 2С/15	27	0,2	67	58,2	30,7	710	6,1
УК 5С/15	31	0,2	87	58,6	38,2	760	6,4
УК 10С/15	32	0,2	83	56,2	35,3	780	6,5
Наталка	91	0,8	357	59,0	62,6	1040	8,0
(УК 10С/15 × Наталка)	55	0,3	303	58,4	63,0	920	7,3
(УК 2С/15 × Наталка)	52	0,3	263	57,6	63,9	800	6,5
((Наталка × УК 2С/15) ЧНаталка)	31	0,2	144	58,0	54,5	980	7,9
(УК 2С/15 × (Наталка × УК 2С/15))	38	0,2	143	60,6	47,3	730	6,2



Рис. 4. Хлебовыпечка мягкой пшеницы и спельты : 1 – Наталка; 2 – УК 2С/15; 3 – УК 10С/15

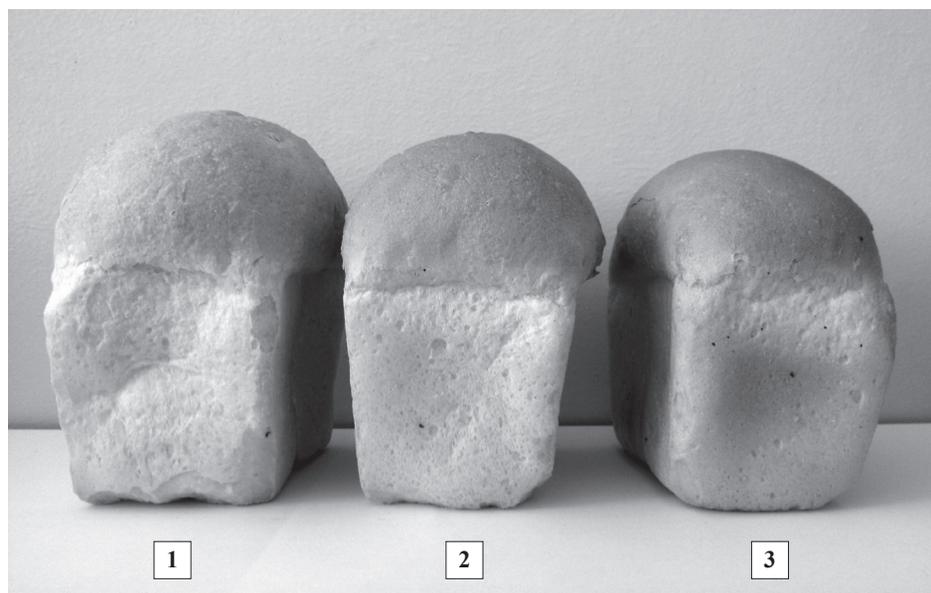


Рис. 5. Хлебовыпечка мягкой пшеницы и гибридов: 1 – Наталка; 2 – ((Наталка × УК 2С/15) × Наталка); 3 – (УК 10С/15 × Наталка)

Заклучение

Нами проведен ПЦР-анализ аллельного состояния генов локусов Glu-A1 и Glu-D1 у родительских компонентов – образцов озимой спельты и сортов мягкой пшеницы и их межвидовых гибридов, что позволило выделить образец спельты УК 10С/15 и гибридные комбинации (УК 10С/15 × Наталка), ((Наталка × УК 2С/15) × Наталка), которые могут быть перспективными для дальнейшей селекционной работы. Показано, что наличие аллеля *d* локуса Glu-D1 повышает хлебопекарные свойства гибридов. Генетическое улучшение спельты путем межвидовой гибридизации с сортами мягкой пшеницы, которые содержат только аллель *d* локуса Glu-D1, может способствовать созданию линий с повышенным содержанием белка и хорошими хлебопекарными качествами.

Список использованных источников

1. Jorgensen, J.R. Yield and quality assessment of spelt (*Triticum spelta* L.) compared with winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in Denmark / J.R. Jorgensen, C.C. Olsen // Spelt and Quina. – Working Group Meeting (24–25 Oct. 1997). – Wageningen, the Netherlands, 1997. – P. 33–38.
2. Eltun, R. The possibilities for spelt cultivation in Norway / R. Eltun, M. Aasven // Spelt and Quina. – Working Group Meeting (24–25 Oct. 1997). – Wageningen, the Netherlands, 1997. – P. 7–13.

3. Dahlstedt, L. Spelt Wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* (L.) An alternative crop for ecological farming systems // Spelt and Quina. – Working Group Meeting (24–25 Oct. 1997). – Wageningen, the Netherlands, 1997. – P. 3–6.

4. Galova, Z. Biochemical characteristics of five spelt wheat cultivars (*Triticum spelta* L.) / Z. Galova, H. Knoblochova // Acta fytotechnica et zootechnica. – 2001. – Vol. 4. – P. 85–87.

5. Campbell, K.G. Spelt: agronomy, genetics, and breeding / K.G. Campbell // Plant Breeding Rev. – 1997. – № 15. – P. 187–213.

6. Шелепов, В.В. Пшеница: биология, морфология, селекция, семеноводство / В.В. Шелепов, Н.Н. Гаврилюк, В.А. Вергунов. – Киев: Логос, 2013. – 498 с.

7. Генетический полиморфизм локусов, определяющих хлебопекарное качество украинских сортов пшеницы / С.В. Чеботарь // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 87–98.

8. Payne, P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality / P.I. Payne // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. – 1987. – Vol. 38. – P. 141–153.

9. Характеристика зразків *Triticum spelta* L. за показниками якості зерна та електрофоретичними спектрами запасних білків / А.К. Нінієва [та ін.] // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 96–105.

10. Исследование коллекции вида пшеницы *Triticum spelta* L. по полиморфизму глиадинов / Ю.А. Романова [и др.] // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 9. – С. 1258–1265.
11. Аллели по локусам запасных белков у образцов *Triticum spelta* L. и их встречаемость у родственных пшениц / Н.А. Козуб [и др.] // Цитология и генетика. – 2014. – Т. 48, № 1. – С. 41–51.
12. Genetic diversity of European spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L. em. Thell.) revealed by glutenin subunit variations at the Glu-1 and Glu-3 loci / X. An [et al.] // Euphytica. – 2005. – Vol. 146. – P. 193–201.
13. Identification of *Glu-B1* alleles in bread wheat cultivars using PCR / D. Obrecht [et al.] // Genetica. – 2007. – Vol. 39, N 1. – P. 23–28.
14. Gale, K.R. Diagnostic DNA markers for quality traits in wheat // J Cereal Sci. – 2005. – Vol. 41. – P. 181–192.
15. Schwarz, G. Development and validation of a PCR-based marker assay for negative selection of the HMW glutenin allele Glu-B1-1d (Bx-6) in wheat / G. Schwarz, F.G. Felsenstein, G. Wenzel // Theor Appl Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 1064–1069.
16. Liu, S. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat / S. Liu, S. Chao, J. Anderson // Theor Appl Genet. – 2008. – Vol. 118. – P. 177–183.
17. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat / M. Boisson [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2005. – Vol. 110, № 5. – P. 932–940.
18. Інформаційна цінність та успадкування алельних варіантів блоків високомолекулярних глютенінів в селекції озимої пшениці на якість зерна / І.А. Панченко [та ін.] // Селекція і насінництво. – 2007. – Вип. 94. – С. 115–128.

S.M. Sichkar, L.H. Velykozhon, O.V. Dubrovna

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS AND BAKING PROPERTIES OF HYBRIDS *TRITICUM SPELTA* L. × *TRITICUM AESTIVUM* L.

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: sichkar07@gmail.com

The allelic status of genes loci Glu-A1 and Glu-D1 in the parental components – samples of winter spelt and varieties of bread wheat and their interspecific hybrids were analyzed. The samples of spelt and hybrid combinations that could be promising for further breeding were obtained. It was shown that *d* allele of Glu-D1 locus improves the baking properties of hybrids. Genetic improvement of spelt by interspecific hybridization with varieties of bread wheat that contain only *d* allele of Glu-D1 locus can give rise to lines with high protein and good baking qualities.

Key words: *Triticum spelta* L., *T. aestivum* L., PCR-analysis, baking quality

Дата поступления статьи 4 января 2017 г.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*RIBES NIGRUM*) И ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: olga.mezhnina@gmail.com

Исследование генетического разнообразия сортов смородины черной, выращиваемых в Беларуси, с использованием 8 локусов микросателлитных последовательностей показало, что современные сорта смородины черной белорусской селекции характеризуются достаточно высоким генетическим разнообразием и имеют генетическое сходство с сортами селекции других стран. Количество аллелей в изученных локусах составило от 3 до 11. Среднее количество уникальных генотипов среди 60 образцов – 17,1. Дискриминационная сила маркеров варьировала от 0,51 до 0,86 и в среднем составила 0,72. Выбранные SSR-маркеры имеют достаточно высокую диагностическую ценность и позволяют проводить идентификацию на молекулярном уровне сортов смородины черной. С помощью SCAR-маркера к гену устойчивости к почковому клещу выявлены сорта, несущие данный маркер и потенциально обладающие генетической устойчивостью к этому вредителю, среди которых сорта белорусской селекции Катюша, Церера и Лошицкая.

Ключевые слова: смородина черная, SSR-маркеры, генетическое разнообразие, ДНК-идентификация.

Введение

Смородина черная (*Ribes nigrum* L.; $2n = 16$) является важным видом ягодных культур. В государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь в 2017 г. было включено 12 ее сортов. В настоящее время сорта смородины черной различают в основном по морфологическим признакам. Их генетический потенциал изучен слабо. Вместе с тем современные молекулярно-генетические методы позволяют оценить генетическое разнообразие сортов на молекулярном уровне, проводить их идентификацию, а также выявлять хозяйственно-ценные гены для селекционной работы. Для изучения генетического разнообразия смородины черной были предложены несколько вариантов неспецифических молекулярных маркеров: RAPD [1, 2, 3] AFLP [4, 5], ISSR [2, 6]. Однако каждая из перечисленных систем идентификации имеет определенные проблемы с воспроизводимостью в различных лабораториях. В 2002 году были разработаны микросателлитные маркеры для этой культуры [7]. Данный тип маркеров обладает рядом преимуществ, среди которых высокий уровень полиморфизма, кодоминантный тип наследо-

вания, относительная простота интерпретации данных и воспроизводимость в различных лабораториях, что позволило SSR-маркерам найти широкое применение для оценки генетического полиморфизма, изучения филогенетических взаимоотношений, построения генетических карт и др. [8]. Не менее важным направлением исследований является разработка молекулярных маркеров к хозяйственно-ценным генам, в частности, к гену устойчивости смородины черной к почковому клещу (*Cecidophyopsis ribis* Westw.) [9]. Заражение почковым клещом приводит к значительным потерям урожая, а при неблагоприятных погодных условиях – к массовой гибели ягодников. Более того, почковый клещ является переносчиком вируса реверсии смородины черной (*black currant reversion virus*, BRV). BRV в течение двух лет может приводить к стерильности растений, что вызывает значительное снижение урожая. [10]. В настоящее время для борьбы с данным вредителем применяются химические средства, которые, однако, могут оказать негативное влияние на окружающую среду. В связи с этим все большее значение приобретает создание сортов черной смородины, устойчивой к почковому клещу,

в частности, вовлечение в селекционный процесс доноров генов *Se* и *P*, обеспечивающих иммунитет к данному вредителю [11, 12].

Таким образом, целью данного исследования являлась оценка генетического разнообразия сортов смородины черной, культивируемых в Республике Беларусь, выявление набора маркеров, пригодных для их идентификации и паспортизации, а также генотипирование сортов на наличие маркеров к хозяйственно-ценным генам.

Материалы и методы

Для молекулярного анализа была сформирована коллекция из 60 сортов смородины черной. Материал предоставлен РУП «Институт плодоводства». Коллекция включала сорта, имеющие различное генетическое происхождение. Среди них – сорта селекции Беларуси, России, Украины, Швеции, Литвы.

Выделение тотальной ДНК из фрагмента листа отдельного растения осуществляли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific, ЕС) согласно методике производителя.

Для анализа полиморфизма по SSR-маркерам использовали мультиплексную ПЦР с 4 парами праймеров в одной реакции соответственно. Каждая пара имела специфическую флуоресцентную метку (FAM, R6G, TAMRA, ROX). В исследовании использовали SSR-маркеры, специфичные для генома *Ribes L.* [13]. Праймеры синтезированы компанией Праймтех (Беларусь).

Состав реакционной смеси с конечным объемом 20 мкл был следующий: 1×ПЦР буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 мМ MgCl_2 , 200 мкМ смеси dNTP, 0,2 мкМ каждого из праймеров, 20–50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы (Thermo scientific, ЕС). Реакцию ПЦР проводили по следующей программе: 1 цикл продолжительностью 4 мин при 94 °С; 35 циклов, включающих: 30 с при 94 °С, 45 с при 50 °С, 45 с при 72 °С; заключительная элонгация – 5 мин при 72 °С.

Разделение фрагментов ПЦР выполняли на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы GeneMapper® Software v4.1 относительно стандартных образцов ДНК известной длины. В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 (Синтол, РФ).

Для идентификации гена *Se* проводили амплификацию с использованием пары праймеров GMresa [14]. Праймеры синтезированы компанией Праймтех (Беларусь). Состав реакционной смеси (конечный объем 20 мкл) был следующий: 1×ПЦР буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 мМ MgCl_2 , 200 мкМ смеси dNTP, 0,2 мкМ каждого из праймеров, 20–50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы (Thermo scientific, ЕС). Реакцию ПЦР проводили по следующей программе: 1 цикл продолжительностью 5 мин при 94 °С; 35 циклов, включающих: 30 с при 94 °С, 45 с при 56 °С, 60 с при 72 °С; заключительная элонгация – 7 мин при 72 °С. Разделение продуктов амплификации проводили в 1%-ном агарозном геле в 1×ТАЕ-буфере с окрашиванием бромидом этидия. Ожидаемый размер целевого фрагмента составлял около 130 п.н.

Расчет частоты аллелей, построение филогенетического дерева с помощью метода ближайших соседей (Neighbour-joining) на основе генетических дистанций между сортами, рассчитанных по формуле, предложенной М. Nei [15], и бутстреп-анализ (Bootstrap analysis) были осуществлены при помощи компьютерной программы Treescop [16].

Значение уровня ожидаемой гетерозиготности вычисляли по формуле:

$$H_e = 1 - \sum(p_i)^2,$$

где p_i – частота встречаемости i -го аллеля [17].

Уровень наблюдаемой гетерозиготности H_o был рассчитан как отношение гетерозиготных генотипов к общему количеству генотипов.

Число эффективных аллелей (N_e) рассчитывали по формуле:

$$N_e = 1 / (1 - H_e)$$

Индекс Райта (F) (Wright's fixation index) вычисляли по формуле [18]:

$$F = 1 - H_o / H_e$$

Дискриминационная сила маркера (PD) была рассчитана по формуле:

$$PD = 1 - \sum(g_i)^2,$$

где g_i – частота встречаемости i -го генотипа [19].

Результаты и обсуждение

Генетическое разнообразие 60 сортов смородины черной оценивали с помощью 8 SSR-маркеров, расположенных на разных хромосомах в геноме *Ribes L.* Наименее полиморфными оказались локусы *e3-B02* и *g1-A01*. Количество обнаруженных в них аллелей составило 4 и 3 соответственно. В локусе *g1-K04* выявлено 6 аллелей, в локусах *g1-E03* и *e1-001* – 8. В локусах *g2-G12* и *E4D03* выявлено по 10 аллелей. Максимальное количество аллелей обнаружено в локусе *g1-M07* – 11. В общей сложности среди 60 сортов смородины черной с использованием 8 SSR-маркеров выявлено 88 полиморфных аллелей. Согласно литературным данным, среднее количество аллелей на locus, определенное с помощью 14 маркеров среди 27 образцов смородины черной из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (ВНИИСПК), составило 4,9 [20]. Этот же показатель среди европейских представителей рода *Ribes L.*, определенный с использованием 11 SSR-маркеров, составил 10,4 [21], что отражает более высокий уровень межвидового генетического разнообразия по сравнению с внутривидовым.

Среди 60 образцов выявлено 10 редких аллелей (встречались у 2% образцов и менее). В зависимости от маркера количество редких аллелей составило от 1 до 3. Для отдельных аллелей частота встречаемости была очень

высокой. Так, в локусе *e3-B02* аллель длиной 161 п.н. был представлен в геноме у 57% исследованных образцов, в локусе *g1-K04* аллель длиной 292 п.н. встречался у 56% образцов. При этом общее количество аллелей, определенное с помощью данных маркеров, составило 4 и 6 соответственно. Результаты расчета количества и размера аллелей, количества и доли уникальных генотипов, уровня ожидаемой (H_e) и наблюдаемой гетерозиготности (H_o), числа эффективных аллелей (N_e), индексы Райта (F), дискриминационной силы маркеров (PD), которые были рассчитаны для 60 сортов смородины черной, представлены в табл. 1.

Уровень ожидаемой гетерозиготности варьировал от 0,507 до 0,866, среднее значение H_e – 0,726. Значение уровня наблюдаемой гетерозиготности (H_o) для исследованной выборки варьировало от 0,483 для маркера *e3-B02* до 0,883 для маркера *E4D03* и в среднем составило 0,698. Значение числа эффективных аллелей (N_e) составило от 1,9 для маркеров *e3-B02* и *g1-A01* до 8,6 для маркера *E4D03*. Среднее значение для всех маркеров составило 4,3. При этом выборка включала сорта как генетически отдаленные, так и имеющие общее происхождение. При исследовании сортов смородины черной селекции ВНИИСПК с использованием 14 SSR-маркеров среднее значение N_e для выборки из 27 сортов составило 0,608 [20]. В исследованиях Savanna с

Таблица 1

Аллели микросателлитных локусов для 60 сортов смородины черной

SSR-маркер	Варьирование размера фрагментов амплификации, п.н.	Количество аллелей	Количество уникальных генотипов	Доля уникальных генотипов	H_e	H_o	N_e	F	PD
<i>g2-G12</i>	167–191	10	26	0,43	0,866	0,767	4,3	0,11	0,86
<i>e1-001</i>	144–166	8	18	0,3	0,802	0,85	6,7	-0,06	0,8
<i>g1-M07</i>	200–230	11	28	0,47	0,833	0,783	4,6	0,07	0,83
<i>e3-B02</i>	161–183	4	5	0,08	0,507	0,483	1,9	0,05	0,51
<i>g1-A01</i>	209–213	3	5	0,08	0,563	0,483	1,9	0,14	0,56
<i>g1-E03</i>	233–270	8	19	0,32	0,778	0,733	3,8	0,06	0,78
<i>g1-K04</i>	284–300	6	11	0,18	0,607	0,6	2,5	0,01	0,61
<i>E4D03</i>	200–226	10	25	0,42	0,849	0,883	8,6	-0,04	0,84
Среднее значение	–	8,6	17,1	0,29	0,726	0,698	4,3	0,04	0,72

соавторами [21] с использованием 11 SSR-маркеров среднее значение H_o для 41 представителя рода *Ribes* L. составило 0,596. Полученные данные свидетельствуют о достаточно высокой степени гетерозиготности смородины черной.

Маркер *g1-M07* позволил выявить максимальное количество уникальных генотипов среди сортов смородины черной – 28. Минимальное количество генотипов выявлено при использовании маркеров *e3-B02* и *g1-A01* – по 5. Среднее значение количества уникальных генотипов для 8 маркеров составило 17,1. Дискриминационная сила маркеров достаточно высокая – от 0,51 для маркера *e3-B02* до 0,86 для маркера *g2-G12*, среднее значение *PD* для 8 маркеров составляет 0,72, что говорит о высокой диагностической ценности отобранных SSR-маркеров.

На основе рассчитанных генетических дистанций между сортами проведен кластерный анализ и сформировано единое консенсусное дерево, в каждом узле которого указан процент поддержки данного кластера (рис. 1). Как видно из представленной дендрограммы, все сорта отличаются друг от друга на генетическом уровне и имеют уникальный состав аллелей в локусах микросателлитных последовательностей. Генетические расстояния между образцами колеблются в пределах от 0,08 до 0,67, при этом генетические расстояния между сортами белорусской и иностранной селекции в целом сходны.

Культурные сорта смородины черной достаточно разнообразны. Они формируют отдельные кластеры, в которые входят как сорта белорусской, так и зарубежной селекции. На наименьшем генетическом расстоянии находятся сорта белорусской селекции Белорусочка и Памяти Вавилова, в родословной которых присутствует сорт Паулинка. Сорта российской селекции Лентяй и Петербурженка имеют в родословной общий сорт Минай Шмырев.

Полученные результаты демонстрируют, что сорта смородины черной, выращиваемые в Республике Беларусь, характеризуются достаточно высоким разнообразием аллелей локусов микросателлитных последовательностей. Данный вывод согласуется с результатами, полученными при исследовании сортов европейской и российской селекции [18–22].

Высокое разнообразие аллелей SSR-локусов в геноме смородины черной позволяет использовать минимальный набор из 8 SSR-маркеров для идентификации и паспортизации сортов, внесенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь, а также других сортов различного селекционного происхождения.

На основе анализа состава SSR-аллелей сорта можно создать его генетический паспорт, который подтвердит уникальность каждого генотипа. Такой паспорт может быть дополнен сведениями о содержании хозяйственно-ценных генов в геноме конкретного сорта. В частности, для смородины черной актуальным на сегодняшний день является создание сортов, невосприимчивых к почковому клещу. К настоящему времени выявлено два гена устойчивости к данному вредителю: ген *P*, перенесенный из *Ribes nigrum* var *sibiricum*, *R. pauciflorum*, *R. petiolare* и *R. ussuriense* [11], и ген *Ce*, полученный от крыжовника [12]. Также существует предположение, что устойчивость к почковому клещу контролируется олигеном *Ce* и у потомков смородины клейкой [23]. Почковый клещ способен инфицировать растения, содержащие ген *P*, однако быстро погибает внутри почек. Помимо этого, при заражении таких растений почковым клещом может происходить и перенос вируса реверсии смородины черной. Растения с геном *Ce*, напротив, не поражаются почковым клещом, что делает данный ген более привлекательным для селекционного процесса.

Анализ коллекции сортов смородины черной на присутствие SCAR-маркера к гену *Ce* показал его наличие в 6 образцах: Кипиана, Церера, Катюша, Лошицкая, Экзотика и Bredtorp. Сорт Кипиана был использован в качестве положительного контроля, т.к. в родословной данного сорта присутствует крыжовник отклоненный, вероятно, являющийся донором гена *Ce*. Наличие маркера в данном сорте было подтверждено ранее [23]. Сорта Церера и Катюша получены от одной комбинации скрещивания: Паулинка × Пилот А. Мамкин, сорт Экзотика – Сеянец Голубки × смесь пыльцы сеянцев от свободного опыления сорта Bredtorp, сорт Лошицкая – Кент (европейский подвид) × отборная форма сибирского подвида. В свою

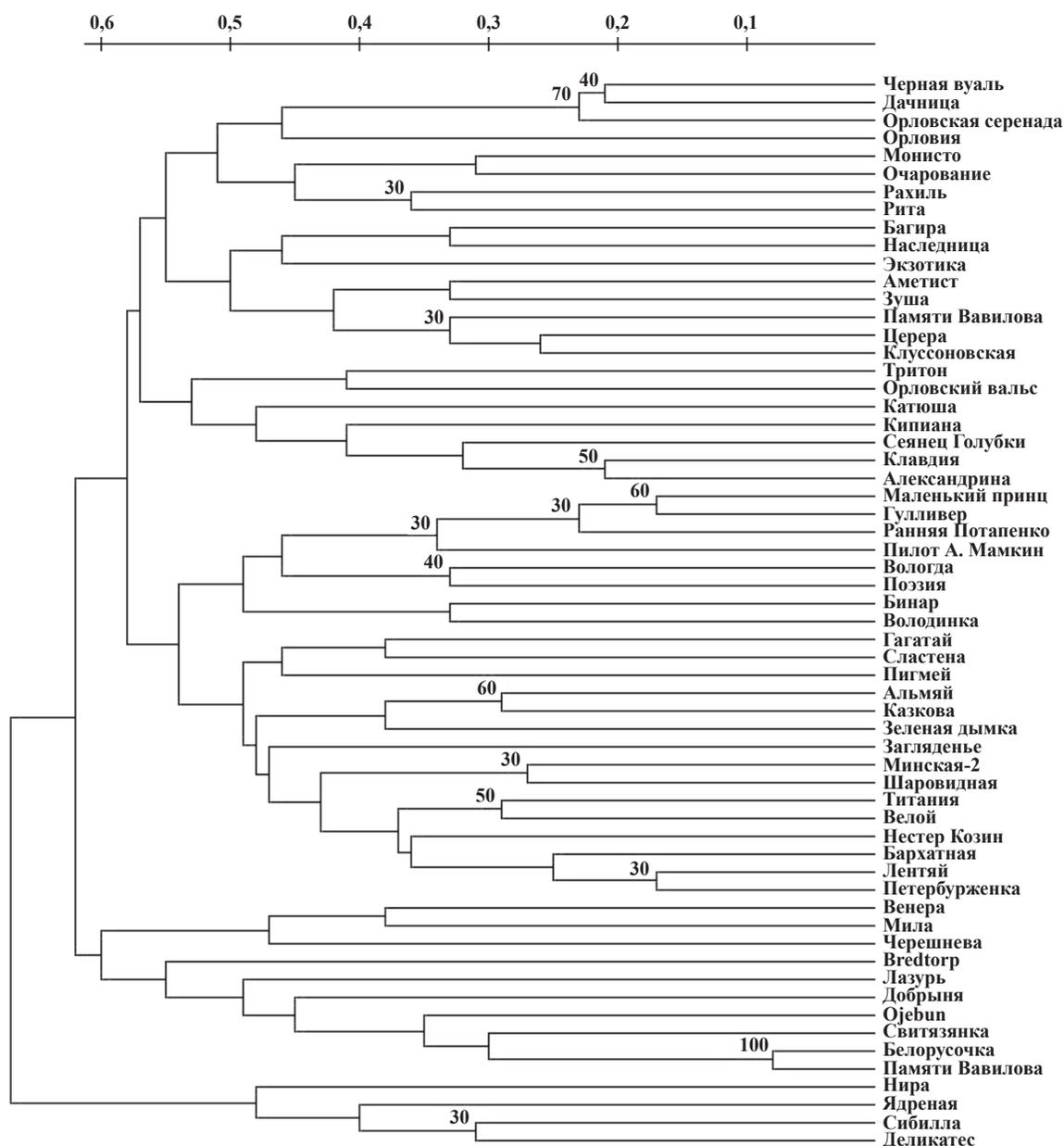


Рис. 1. Дендрограмма генетического сходства сортов смородины черной, построенная на основе результатов SSR-анализа. Цифры на дендрограмме обозначают значения бутстрепа. На шкале сверху отмечено генетическое расстояние

очередь, сорт Паулинка произошел от скрещивания европейских сортов с формой сибирского подвида и сортом Голубка, а сорт Пилот А. Мамкин – в результате скрещивания формы 2-4Д и формы смородины дикуши. Сорт Vredtopr имеет скандинавское происхождение и является отборной формой местного финского сорта. Таким образом, в родословной данных сортов в качестве предковой формы отсутствует крыжовник, однако присутствует сибирский подвид смородины черной (донор гена *P*),

который также обеспечивает устойчивость к почковому клещу. Необходимо отметить, что тестируемый SCAR-маркер не является функциональным, т.к. не выявляет непосредственно ген *Se*, а находится от него на расстоянии 4 сМ [12], что допускает вероятность рекомбинации между маркером и геном. Для применения в маркер-сопутствующей селекции необходимы дополнительные испытания по оценке поражаемости почковым клещом сортов, в которых присутствует данный маркер.

Заклучение

Исследовано генетическое разнообразие 60 сортов смородины черной, культивируемых в Республике Беларусь, с помощью 8 SSR-маркеров. Полученные результаты демонстрируют, что сорта смородины черной, выращиваемые в Республике Беларусь, характеризуются достаточно высоким разнообразием аллелей локусов микросателлитных последовательностей. Определено, что среднее количество аллелей на локус среди 60 образцов составило 8,6. Среднее количество уникальных генотипов в расчете на маркер – 17,1. Значение дискриминационной силы для всех маркеров высокое и в среднем составляет 0,72. На основании анализа полиморфизма SSR-локусов был сформирован набор из 8 маркеров, позволяющий проводить генетическую идентификацию сортов смородины черной. Маркеры охватывают различные участки генома *Ribes* L. и расположены на разных хромосомах. Предложенный набор SSR-маркеров может применяться для идентификации возделываемых сортов смородины черной, охраны авторских прав селекционных учреждений, для контроля сохранности уникального коллекционного материала и др. С помощью SCAR-маркера к гену устойчивости к почковому клещу выявлены сорта, несущие данный маркер и потенциально обладающие генетической устойчивостью к этому вредителю, среди которых – сорта белорусской селекции Катюша, Церера и Лошицкая.

Список использованных источников

1. Korbin, M. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR / M. Korbin, A. Kuras, E. Zurawicz // Mol. Biol. Lett. – 2002. – Vol. 7. – P. 785–794.
2. Lanham, P.G. Genetic diversity within a secondary pool for *Ribes nigrum* L. revealed by RAPD and ISSR markers / P.G. Lanham, A. Korycinska, R.M. Brennan // J. Hort. Sci. Biotech. – 2000. – Vol. 75. – P. 371–375.
3. Lanham, P. Fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars using RAPD analyses / P. Lanham, R.M. Brennan, R.J. McNicol // Theor. Appl. Genet. – 1995. – Vol. 90. – P. 166–172.
4. Brennan, R.M. Future perspectives in black currant breeding / R.M. Brennan, S.L. Gordon // Acta Hort. – 2002. – Vol. 585. – P. 39–45.
5. Chloroplast and nuclear DNA markers to characterize cultivated and spontaneous *Ribes* / F. De Mattia [et al.] // Plant Biosyst. – 2008. – Vol. 142, No. 2. – P. 204–212.
6. Lanham, P.G. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers / P.G. Lanham, R.M. Brennan // J. Hort. Sci. – 1999. – Vol. 74. – P. 361–366.
7. Development and characterisation of SSR markers in *Ribes* species / R.M. Brennan [et al.] // Mol Ecol Note. – 2002. – Vol. 2. – P. 327–330.
8. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants / R.K. Kalia [et al.] // Euphytica. – 2011. – Vol. 177, No. 3. – P. 309–314.
9. Brennan, R.M. Currants and gooseberries / R.M. Brennan; ed. J.F. Hancock // Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics. – Springer, The Netherlands, 2008. – P. 177–196.
10. Jones, A.T. Improved PCR Detection of blackcurrant reversion virus in *Ribes* and further evidence that it is the causal agent of reversion disease / A.T. Jones, W.J. McGavin // Plant Dis. – 2002. – Vol. 86. – P. 1333–1338.
11. Anderson, M.M. Resistance to the gall mite (*Phytoptus ribis* Nal.) in the Eucoreosma section of *Ribes* / M.M. Anderson // Euphytica. – 1971. – Vol. 20. – P. 422–426.
12. Transference of resistance to blackcurrant gall mite, *Cecidophyopsis ribis*, from gooseberry to blackcurrant / R.L. Knight [et al.] // App. Biol. – Vol. 76. – P. 123–130.
13. The development of a genetic linkage map of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits / R.M. Brennan [et al.] // Euphytica. – 2008. – Vol. 161. – P. 19–34.
14. The development of a PCR-based marker linked to resistance to the blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis* Acari: Eriophyidae) / R.M. Brennan [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2009. – Vol. 118. – P. 205–211.
15. Nei, M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W.H. Li // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76. – P. 5269–5273.
16. Van de Peer, Y. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees / Y. Van de Peer, R. De Wachter // Comput. Applic. Biosci. – 1993. – Vol. 9. – P. 177–182.

17. Nei, M. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance / M. Nei, A.K. Roychoudhury // *Genetics*. – 1974. – Vol. 76. – P. 379–390.
18. Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating / S. Wright // *Evolution*. – 1965. – Vol. 19. – P. 395–420.
19. Kloosterman, A.D. PCR-amplification and detection of the human DIS 80 VNTR locus. Amplification condition, population genetics and application in forensic analysis / A.D. Kloosterman, B. Budowle, P. Daselaar // *Int. J. Leg. Med.* – 1993. – Vol. 105. – P. 257–264.
20. Microsatellite loci polymorphism in Russian black currant (*Ribes nigrum* L.) varieties from collection of All-Russian Research Institute of Breeding Fruit Crops / A.V. Pikunova [et al.] // *Agricultural Biology*. – 2015. – Vol. 50, No. 1. – P. 46–54.
21. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm / M. Cavanna [et al.] // *Genome*. – 2009. – Vol. 52. – P. 839–848.
22. Palmieri, L. Establishment of molecular markers for germplasm management in a worldwide provenance *Ribes* spp. collection / L. Palmieri [et al.] // *POJ*. – 2013. – Vol. 6, No. 3. – P. 165–174.
23. Эффективность методов селекционных исследований смородины черной (*Ribes nigrum* L.) / С.Д. Князев [и др.] // *Вестник ОрелГАУ*. – 2014. – Т. 5, № 50. – С. 120–133.

O.A. Mezhnina, O.Yu. Urbanovich

IDENTIFICATION OF BLACK CURRANT CULTIVARS (*RIBES NIGRUM*) AND THE DETECTION OF GENES ASSOCIATED WITH AGRONOMIC VALUABLE TRAITS USING THE MOLECULAR MARKERS TECHNOLOGY

Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus
Minsk BY-220072, Republic of Belarus

The study of genetic variability of *Ribes* L. representatives grown in Belarus using 8 microsatellite markers showed that modern Belarussian varieties of black currant are characterized by sufficiently high genetic variability and have close genetic relationship with foreign varieties. The number of alleles in the studied loci was from 3 to 11. The average number of unique genotypes among 60 samples was 17.1. The discrimination power of markers varied from 0.51 to 0.86 and the mean value was 0.84. All markers possess sufficiently high diagnostic value and allow to identify black currant and gooseberry varieties at the molecular level and can be recommended for the DNA-identification of those cultures. Using the SCAR-marker to the gene resistant to Bud mite, we identified the cultivars carrying this marker and that potentially have genetic resistance to this pest, among them the Belarussian selection varieties – Katyusha, Cerera and Loshitskaja.

Key words: black currants, SSR markers, genetic diversity, DNA identification.

Дата поступления статьи 6 января 2017 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) несет 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 22

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

Подписано в печать 21.02.2017. Формат 60×84 ¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 13,49. Уч.изд. л. 8,53. Тираж 100 экз. Заказ № 79
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